

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Jitka Brožová

Role B buněk v transplantačních reakcích

The Role of B Cells in Transplantation Reactions

Diplomová Práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2014

Poděkování

Děkuji svému školiteli, doc. MUDr. Antoniji Slavčevovi, CSc., za odborné vedení při psaní diplomové práce a věnovaný čas. Dále děkuji mé kolegyni Mgr. Kateřině Rybákové za velkou podporu a asistenci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji Mgr. Evě Svobodové a RNDr. Liboru Kolesárovi Ph.D. za cenné rady.

Velký dík patří také mé rodině a blízkým, kteří mě podporovali celé mé studium.

Abstrakt

Hlavním problémem při transplantaci ledvin je vývoj celulární a protilátkami zprostředkované (humorální) rejekce. Za poslední desetiletí, díky zlepšení účinnosti imunosupresivních léků, došlo ke zlepšení prognózy na přežití transplantovaných orgánů. Nicméně, humorální rejekce stále zůstává velmi závažným problémem u rizikových pacientů, protože může trvale poškodit štěp. Vzhledem k tomu je nutné již před transplantací rozdělit pacienty s vysokým a nízkým rizikem vzniku protilátkami-zprostředkované rejekce. Současná imunogenetická vyšetření před transplantací zahrnuje, kromě HLA typizace, detekci panel-reaktivních protilátek pacienta. Avšak ta neposkytuje informaci o B buňkách, které se účastní humorální odpovědi příjemce ledviny. Z toho důvodu se předložená diplomová práce zabývá analýzou B buněčné reaktivity a její regulace u transplantovaných pacientů.

V této retrospektivní analýze jsme zkoumali hladiny faktoru regulující funkci B lymfocytů (BAFF). Z dosud publikovaných prací vyplývá, že BAFF by mohl sloužit jako marker humorální rejekce. Dále jsme se zaměřili na B lymfocyty a jejich schopnost produkovat protilátky pomocí metody IgG ELISpot (Enzyme-linked immunosorbent spot). V literatuře se uvádí, že IgG ELISpot by mohla predikovat produkci protilátek a tudíž predikovat riziko vývoje humorální rejekce po transplantaci. Koncentraci BAFF a výsledné hodnoty ELISpot testu jsme korelovali se vznikem humorální, popřípadě celulární rejekce a dále s vybranými imunologickými faktory (např. HLA, DSA, koncentrace sérového kreatininu).

Naše data naznačují, že pacienti s humorální rejekcí mají nižší hladiny BAFF cytokinu po transplantaci oproti pacientům bez rejekce. Metodou IgG ELISpot jsme zjistili, že před transplantací od živého dárce mají pacienti s humorální rejekcí signifikantně vyšší počet B lymfocytů produkujících protilátky. Tato metoda by mohla sloužit pro určení rizika vzniku humorální rejekce po transplantaci ledvin.

Klíčová slova: protilátkami-zprostředkovaná rejekce, BAFF, ELISpot, HLA protilátky, imunoglobulin G, Luminex, transplantace ledviny

Abstract

Kidney transplantation is the best treatment for patients with end-stage renal failure. The main problem of kidney transplantation is however the development of a cellular and antibody-mediated (humoral) rejection. During the last decade, thanks to the advanced immunosuppression, prognosis of survival and function of transplanted organs has significantly improved. Nevertheless, humoral rejection remains very serious obstacle in high-risk patients, because it can permanently damage the graft. Therefore, before transplantation it is necessary to stratify patients into high and low risk groups for development of antibody-mediated rejection. Current immunogenetic tests performed before transplantation include, in addition to HLA typing, detection of panel-reactive antibodies. However, this test does not provide information about B cells which participate in the humoral response of the kidney recipient. Therefore, in the presented thesis we studied B cell reactivity and its regulation in transplanted patients.

In this retrospective analysis we measured levels of the B cell activating factor, a cytokine regulating the function of B lymphocytes (BAFF). Current reports suggest that BAFF could serve as a marker of humoral rejection. Furthermore, we focused on B lymphocytes and their capacity to produce antibodies using an IgG ELISpot assay (Enzyme-linked immunosorbent spot). Literature studies indicate that IgG ELISpot could predict the production of antibodies and thus the risk of development of humoral rejection after transplantation. Concentrations of BAFF and ELISpot results were correlated with the development of humoral or cellular rejection and with selected immunological risk factors for rejection (eg. HLA, donor-specific antibodies).

Our data indicate that patients with humoral rejection have a trend of lower levels of the BAFF cytokine after transplantation than patients free of rejection. Using the IgG ELISpot assay, we found that prior to transplantation from living donors patients with humoral rejection have significantly higher frequencies of antibody producing B cells. This method could be used to determine the risk of antibody-mediated rejection after kidney transplantation.

Key words: antibody-mediated rejection, BAFF, ELISpot, HLA antigens, immunoglobulin G, Luminex, kidney transplantation

Obsah

Seznam zkratk.....	4
1 Úvod	6
2 Literární přehled	8
2.1 HLA systém	8
2.1.1 HLA antigeny I. třídy	9
2.1.2 HLA antigeny II. třídy	10
2.1.3 Rozpoznání HLA antigenů	10
2.2 Transplantační reakce	13
2.2.1 Celulární rejekce.....	14
2.2.2 Rejekce zprostředkovaná protilátkami	15
2.2.2.1 Hyperakutní rejekce	15
2.2.2.2 Akutní humorální rejekce.....	16
2.2.3 Chronická rejekce.....	17
2.3 B lymfocyty a rejekce	18
2.3.1 Vývoj B lymfocytů	18
2.3.1.1 B-cell activating factor (BAFF)	20
2.3.1.2 Dlouho žijící plazmatické buňky.....	22
2.3.1.3 Paměťové B lymfocyty	23
2.3.1.4 HLA protilátky	23
3 Cíle diplomové práce.....	25
4 Experimentální část	26
4.1 Schéma experimentů.....	26
4.1.1 Experiment 1 – BAFF cytokin.....	26
4.1.2 Experiment 2 – IgG Enzyme-linked Immunosorbent spot assay (ELISpot) .	27
4.2 Použité přístroje a chemikálie	28
4.2.1 Přístroje, materiál.....	28

4.2.2	Chemikálie.....	28
4.3	Metody.....	30
4.3.1	Xmap metodika (Luminex)	30
4.3.2	Izolace buněk z krve	31
4.3.3	Zmražení buněk	32
4.3.4	Rozmražení buněk	32
4.3.5	Příprava směsi kontrolních buněk (POOL)	32
4.3.6	Směsné lymfocytární kultury (MLC)	33
4.3.7	IgG Enzyme-linked Immunosorbent spot assay (ELISpot).....	34
4.3.8	Stanovení anti-HLA protilátek metodou LabScreen	35
4.4	Statistické zpracování dat	36
5	Výsledky.....	37
5.1	Experiment 1 - BAFF cytokin.....	37
5.1.1	Demografické údaje ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce.....	37
5.1.2	Demografická data ve vztahu s kombinovanou rejekcí.....	40
5.1.3	Vybrané faktory ve vztahu k výskytu akutní humorální	42
5.1.4	Vybrané faktory ve vztahu k výskytu kombinované rejekce	44
5.2	Experiment 2 - IgG ELISpot.....	48
5.2.1	Demografická data.....	48
5.2.2	Rizikové faktory ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce	50
6	Diskuze	53
7	Závěr	59
8	Seznam obrázků.....	60
9	Literatura	61

Seznam zkratek

Zkratka	Anglický název	Český název
ACR	Acute cellular rejection	Akutní celulární rejekce
ALP	Alcaline phosphatase	Alkalická fosfatáza
AMR	Acute antibody mediated rejection	Akutní humorální rejekce
APC	Antigen presenting cell	Buňka prezentující antigen
APRIL	A proliferation-inducing ligand	
ATG	Antithymocyte globuline	Antithymocytární globulin
ATN	Acute tubular necrosis	Akutní tubulární nekróza
BAFF	B-cell activating factor	B buněčný aktivační faktor
BAFF-R, BR3	B-cell activating factor receptor	Receptor B buněčného aktivačního faktoru
BAFF-s	Soluble BAFF	Solubilní BAFF
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát / nitrotetrazoliová modř
BCMA	B-cell maturation antigen	
BCR	B cell receptor	B buněčný receptor
CDC	Complement dependent cytotoxicity assay	Komplement-dependentní cytotoxický test
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	Cytotoxický T lymfocyt
DC	Dendritic cell	Dendritická buňka
DL	Kidney donor	Dárce ledviny
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
DSA	Donor specific antibodies	Donor-specifické protilátky
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	
ELISpot	Enzyme-linked immunosorbent spot assay	
ER	Endoplasmic reticulum	Endoplazmatické retikulum
FasL	Fas ligand	Fas ligand
FCS	Fetal calf serum	Fetální hovězí sérum
FCXM	Flow cytometry crossmatch	Křížová zkouška využívající průtokové cytometrie
HLA (I/II)	Human leukocyte antigen (class I/II)	Lidské leukocytární antigeny (I./II. třídy)

IFN-α/γ	Interferon alpha/gamma	Interferon alfa/gama
Ig	Immunoglobulin	Imunoglobulin
IKEM	Institute for Clinical and Experimental Medicine	Institut klinické a experimentální medicíny
IL	Interleukin	Interleukin
LT	Lymphotoxin	Lymfotoxin
MAC	Membrane attack complex	
MF	Macrophage	Makrofág
MFF	Mycophenolate mofetil	Mykofenolát mofetil
MFI	Median fluorescence intensity	
MHC	Major histocompatibility complex	Hlavní histokompatibilní komplex
MLC	Mixed lymphocyte cultures	Směsné lymfocytární kultury
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Mediátorová ribonukleová kyselina
MZ	Marginal zone	Marginální zóna
NK	Natural killer cell	Přirozený zabijáč
NS		Nesignifikantní
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	Mononukleární buňky v periferní krvi
PBS	Phosphate buffered saline	Fosfátový pufr
PCR-SSOP	Polymerase chain reaction - Sequence-specific primer	Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami
PCR-SSP	Polymerase chain reaction - Sequence-specific oligonucleotide probe	Polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery
PE	Phycoerythrin	Fykoerytrin
PL	Kidney recipient	Příjemce ledviny
PRA	Panel reactive antibodies	Panel-reaktivní protilátky
RT	Room temperature	Pokojová teplota
SI	Stimulation index	Stimulační index
TACI	Transmembrane activator and calcium modulator	
TAP	Transporter associated with antigen processing	
TCR	T cell receptor	T buněčný receptor
Th	Helper T lymphocyte	Pomocný T lymfocyt
TNF	Tumour necrosis factor	Faktor nekrotizující nádory

1 Úvod

Úspěšnému dlouhodobému přežití transplantovaných orgánů brání imunitní reakce (reakce). Rizikové faktory reakce jsou imunologického i neimunologického původu. Nedávno se za primární efektorové buňky akutní reakce považovaly T lymfocyty, zatímco role různých složek přirozené a humorální imunity nebyla dostatečně probádána. V posledních letech se intenzivně začala zkoumat úloha B buněk a HLA-specifických protilátek (aloprotiátek) při transplantačních reakcích. Ukázalo se, že pacienti, u kterých jsou před i po transplantaci přítomné donor-specifické protilátky, tj. protilátky namířené proti neshodným antigenům dárce, mají vyšší pravděpodobnost vývoje humorální reakce (Abe et al., 1997, Burns et al., 2008, Lefaucheur et al., 2010).

Humorální reakce má obvykle horší prognózu a vyžaduje mnohem náročnější imunosupresivní terapii než reakce celulární. Kromě vývoje nových účinných imunosupresivních léků v posledních letech, byly vyvinuty senzitivní diagnostické testy na stanovení protilátek proti HLA a non-HLA antigenů. Tyto testy výrazně usnadnily diagnostiku akutní humorální reakce a rovněž přispívají k vyhodnocení imunologického rizika pacientů před transplantací. Přesto je diagnostika reakce zprostředkované protilátkami stále obtížná. Ta se opírá z velké části o detekci aloprotiátek v sérech pacientů a o nález C4d depozitů v peritubulárních kapilárách transplantovaných orgánů (Colvin & Smith, 2005). Samotná detekce protilátek v periférii ale neposkytuje informaci o B lymfocytech, které tyto protilátky produkují. Proto je v současné době snaha o zavedení nových biomarkerů a funkčních analýz, které by pomohli sledovat komplexní předtransplantační a potransplantační stav imunitního systému pacienta (Bestard et al., 2010, Böhmig et al., 2010).

Jedním z testů funkční analýzy, která monitoruje B buněčnou reaktivitu příjemce namířenou proti dárce je IgG ELISpot (Enzyme-linked immunosorbent spot assay). Tento test zjišťuje počet B lymfocytů, které produkují donor-specifické protilátky a mapuje tak humorální imunitní odpověď organismu proti transplantátu. V diplomové práci se touto metodou blíže zabýváme. Určili jsme počty (frekvence) B lymfocytů produkujících imunoglobulin G (IgG) u sledované skupiny pacientů. B lymfocyty byly před samotným testem *in vitro* stimulovány přímo buňkami dárce ve směsných lymfocytárních kulturách.

V další části této práce se zabýváme BAFF cytokinem (B-cell activating factor). BAFF je důležitý faktor, který hraje důležitou roli při maturaci B lymfocytů, jejich celkovém přežívání a účastní se dalších významných imunologických dějů, které mohou

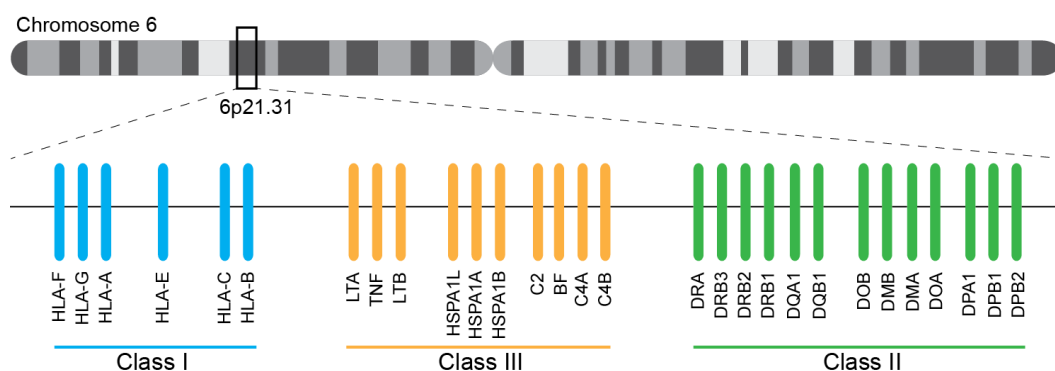
vést až k odvrhnutí (reakci) štěpu u transplantovaných pacientů. Zvýšená koncentrace BAFF je spojována s vývojem reakce štěpu proti hostiteli po transplantaci hematopoetických kmenových buněk a se zhoršenou funkcí transplantované ledviny (Xu et al., 2008, Mariette et al., 2003, Sarantopoulos et al., 2009). Dosavadní poznatky o rozmanité funkci BAFF cytokinu v imunitním systému naznačují, že by se mohl podílet na rozvoji humorální reakce a být tak považován za její marker. Tuto hypotézu ověřujeme u rizikové skupiny pacientů s humorální reakcí po transplantaci ledvin, kde jsme hledali spojitost mezi výskytem reakce a koncentrací BAFF cytokinu v séru.

2 Literární přehled

2.1 HLA systém

Nejvíce polymorfním genovým úsekem v lidském genomu je hlavní histokompatibilní komplex (MHC), u lidí nazývaný též jako HLA systém (Human leukocyte antigen). Ten je tvořen povrchovými glykoproteiny - HLA antigeny I. a II. třídy, které prezentují peptidové fragmenty, cizí nebo vlastní, buňkám imunitního systému (Tiercy, 2002). Při orgánové transplantaci mezi neidentickými jedinci buňky imunitního systému příjemce mohou rozpoznávat neshodné HLA (a jiné) antigeny dárce jako cizí. Bez adekvátní imunosupresivní léčby dochází rychle k aktivaci přirozených i adaptivních imunitních mechanismů a k nenávratné rejekci transplantovaného orgánu (Penn, 2002).

HLA komplex se skládá ze tří regionů a nachází se na krátkém raménku chromozomu 6 (viz Obr. 1). První oblast HLA I. třídy zahrnuje klasické antigeny HLA-A, HLA-B, HLA-C a dále také tzv. neklasické antigeny HLA-D, HLA-E, HLA-F. Oblast HLA (antigenů) II. třídy obsahuje antigeny HLA-DP, HLA-DR, HLA-DQ. Na rozdíl od předchozích dvou třetí oblast nekóduje HLA antigeny. Nacházejí se zde geny kódující některé složky komplementu, TNF (Tumour necrosis factor), HSP (Heat-shock protein) a další (Choo, 2007). HLA systém obsahuje 11 389 známých alel. Tento počet alel neustále roste (IMGT database - Robinson et al., 2011).

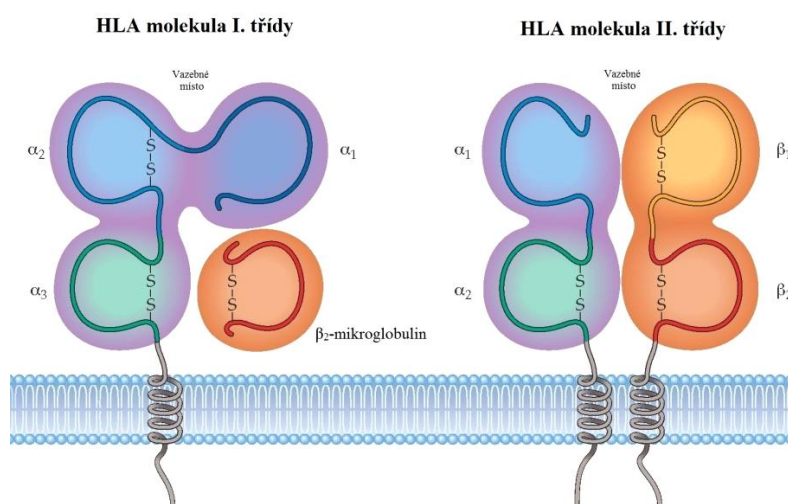


Obr. 1: HLA systém na chromozomu 6 (Převzato z <http://www.sciscogenetics.com/technology/human-leukocyte-antigen-complex/>).

2.1.1 HLA antigeny I. třídy

HLA antigeny I. třídy dělíme na klasické (HLA Ia) HLA-A, HLA-B, HLA-C a neklasické (HLA Ib) HLA-E, HLA-F, HLA-G. Vyskytují se ve formě heterodimerů a jsou tvořeny α -řetězcem a β_2 -mikroglobulinem. α -řetězec se skládá z pěti domén, tří extracelulárních (α_1 , α_2 , α_3), kde domény α_1 a α_2 tvoří uzavřené vazebné místo pro zpracované peptidy o délce 8 - 10 aminokyselin. Dále z jedné transmembránové domény a z cytoplazmatického ocásku (viz Obr. 2), (Choo, 2007).

Klasické HLA glykoproteiny I. třídy jsou exprimovány na povrchu všech jaderných buněk v těle, i přesto, že se jejich povrchová exprese může mezi různými typy buněk výrazně lišit. Mezi buňky s vysokou expresí (typicky) patří lymfocyty, naopak málo exprimující HLA molekuly jsou buňky svalové a mozkové. Funkcí HLA I je ve většině případů prezentovat endogenní peptidy (vlastní nebo virové) CD8⁺ T lymfocytům. K navázání daného peptidu na glykoprotein I. třídy je zapotřebí několik kroků. Celý proces začíná v cytoplasmě buňky, kde jsou ubiquitinylované peptidy rozštěpeny na peptidové fragmenty v proteolytickém komplexu, proteazomu. Současně dochází k syntéze a poskládání HLA molekuly I. třídy na povrchu endoplazmatického retikula (ER). Po úspěšném složení HLA molekuly může dojít k navázání peptidového fragmentu do vazebného místa v lumen ER. Peptidové fragmenty se do lumen ER dostávají pomocí TAP molekul (Transporter associated with antigen processing) a poté dochází k jejich navázání na HLA molekulu I. třídy. Komplex HLA molekuly a peptidu je v zápětí exocytován na buněčný povrch (Klein & Sato, 2000a).



Obr. 2: Schematické znázornění struktury HLA molekul I. a II. třídy (Převzato a upraveno z <http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/04/tmp4C9.jpg>).

2.1.2 HLA antigeny II. třídy

HLA antigeny II. třídy (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ) jsou tvořeny nekovalentní asociací α -řetězce a β -řetězce. Řetězce jsou kódovány geny označenými A a B (např. DRA a DRB pro molekulu HLA-DR). Řetězce α i β mají celkem čtyři domény, kde $\alpha 1$ a $\alpha 2$ jsou extracelulární domény (platí i pro $\beta 1$ a $\beta 2$). Dále obsahuje transmembránovou doménu a cytoplazmatický ocas (viz Obr. 2). Vazebné místo pro peptidový fragment je tvořeno doménami $\alpha 1$ a $\beta 1$. Na rozdíl od molekul I. třídy, je u molekul II. třídy vazebné místo otevřené a váží se sem peptidy o délce 12 a více aminokyselin (Choo, 2007).

HLA antigeny II. třídy jsou exprimovány na dendritických buňkách (DC), makrofázích (MF), B lymfocytech, aktivovaných T lymfocytech a epitelálních buňkách thymu. V přítomnosti zvýšené koncentrace interferonu- γ (IFN- γ) jsou molekuly II. třídy exprimovány i na dalších buňkách, jako jsou endotelové, epitelové a tubulární buňky ledviny atd.

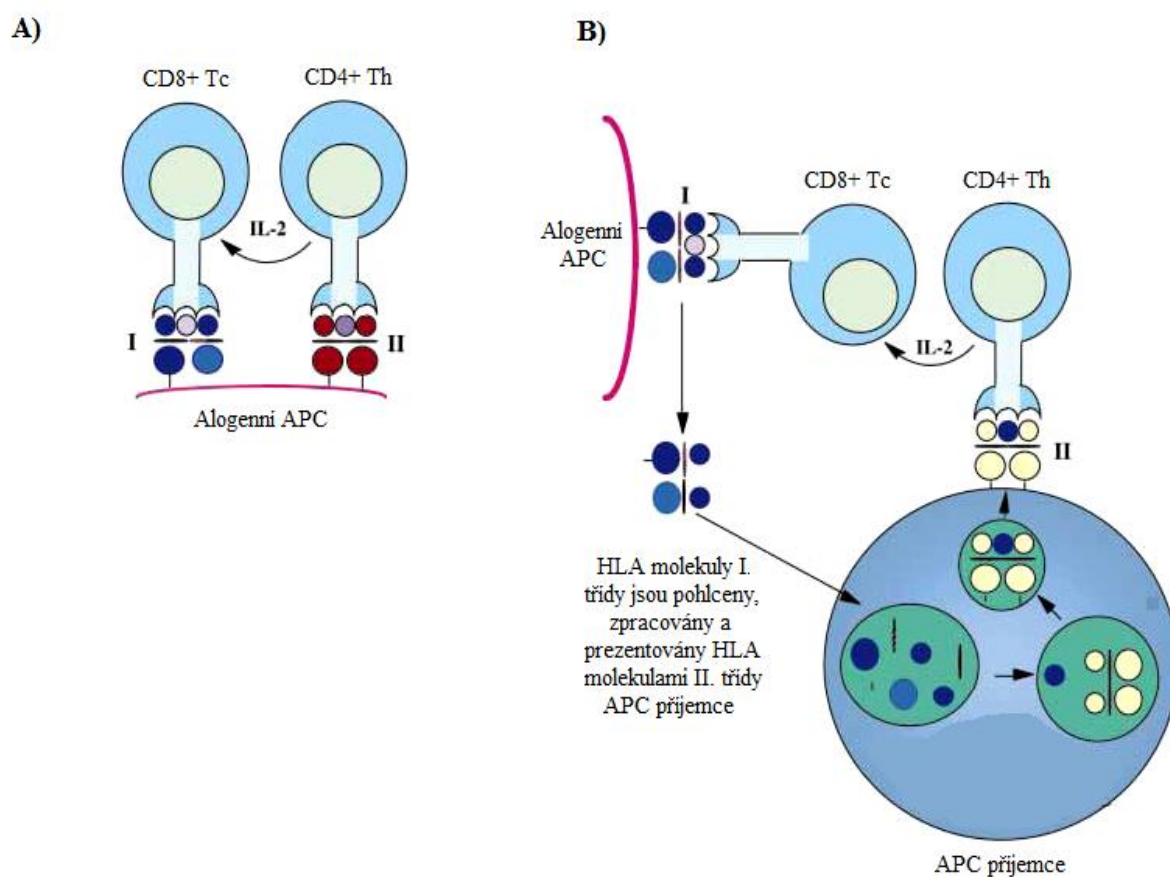
Do vazebného místa molekul II. třídy se převážně váží peptidy exogenního původu. Exogenní peptid je buňkou endocytován nebo fagocytován. Syntéza HLA molekul II. třídy je obdobná jako u I. třídy. Probíhá v ER, avšak k navázání peptidového fragmentu nedochází hned, neboť je vazebné místo (HLA molekuly) blokováno invariantním řetězcem. V takovéto formě se dostává HLA molekula II. třídy skrze Golgiho aparát ve vesiklu do cytoplazmy. Tento váček následně splyne s endozomem a poté s časným lysozomem. Exogenní peptid a invariantní řetězec jsou degradovány působením enzymů z lysozomu. Pomocí molekuly HLA-DM je zbytek invariantního řetězce (ve vazebném místě) vyměněn za peptidový fragment a úplný komplex je pak exocytován (Klein & Sato, 2000a).

2.1.3 Rozpoznání HLA antigenů

Rejekce transplantovaného orgánu začíná rozpoznáním neshodných HLA antigenů ve štěpu dárce. Primární roli v odpovědi na cizí tkáň hrají T lymfocyty, které rozpoznávají HLA antigeny dárce aloantigeny svým T buněčným receptorem (TCR) ve spolupráci s koreceptory CD4 anebo CD8. Cytotoxické T lymfocyty (CD8+) váží peptid v komplexu s HLA molekulou I. třídy (HLA I) a pomocné T lymfocyty (CD4+) s HLA molekulou II. třídy (HLA II), (Klein & Sato, 2000a). Ovšem k aktivaci T lymfocytů, které svými TCR rozpoznaly komplexy HLA molekul s navázaným peptidem, dochází za nezbytné

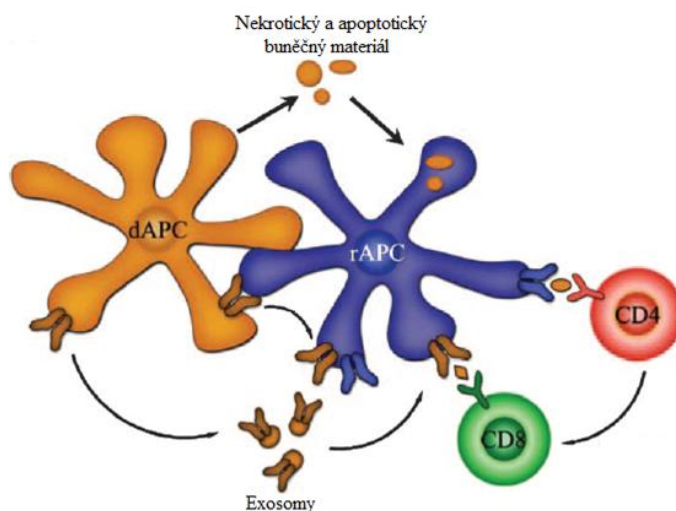
přítomnosti kostimulačních signálů (interakce CD28/CD80, CD28/CD86, CD40/CD154), (Game & Lechler, 2002).

T lymfocyty rozpoznávají aloantigeny třemi různými způsoby: přímé, nepřímé a částečně přímé rozpoznání. U přímého způsobu T lymfocyty příjemce (CD4+, CD8+) rozpoznávají cizí HLA molekulu (HLA I a HLA II) na dárcovských buňkách prezentujících antigen (APC), tzv. passenger leukocytes (viz Obr. 3). Při nepřímém rozpoznání jsou HLA molekuly dárce zpracovány a prezentovány v komplexu s HLA molekulami na APC příjemce (viz Obr. 3), (Afzali, Lechler, & Hernandez-Fuentes, 2007).



Obr. 3: Přímé (A) a nepřímé (B) rozpoznání HLA molekul (Převzato a upraveno z Rogers & Lechler, 2001).

Polopřímé rozpoznání je nedávno objevený způsob, kdy DC příjemce získají neporušené funkční komplexy MHC-peptid z dendritických a endoteliálních buněk štěpu a prezentují je T lymfocytům (CD4+, CD8+) příjemce. Mechanismus polopřímého rozpoznání pravděpodobně zahrnuje těsný buněčný kontakt a dále uvolňování a příjem exosomů s komplexy MHC-peptid (viz Obr. 4), (Herrera et al., 2004).

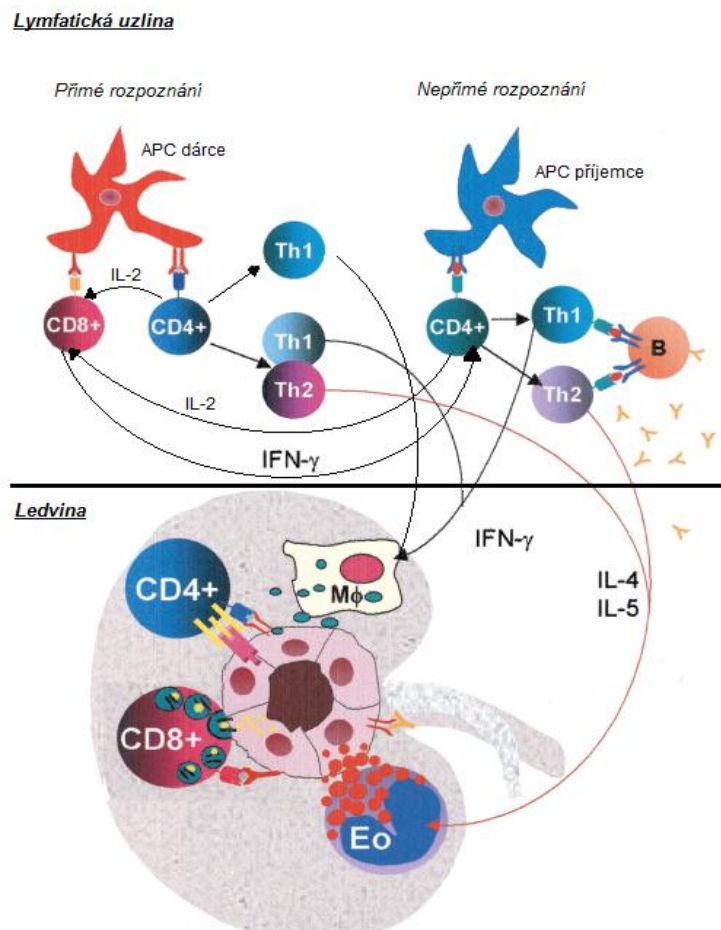


Obr. 4: Mechanismus polopřímého rozpoznání (Převzato a upraveno z Afzali et al., 2007).

V důsledku úbytku APC dárce se přímé rozpoznání antigenů po transplantaci časem vytrácí (do několika týdnů) a převládá rozpoznání nepřímé (Rogers & Lechler, 2001). Přímé rozpoznání je zodpovědné za časnou akutní rejekci a pravděpodobně touto cestou vznikají paměťové T lymfocyty, vyvolávající pozdní rejekční epizody. Nepřímé rozpoznání se vyskytuje jak u akutní tak i u chronické rejekce, v důsledku neustálého proudění nových APC příjemce do štěpu (Afzali et al., 2007).

2.2 Transplantační reakce

Rozpoznání HLA antigenů spouští mnoho efektorových mechanismů vedoucích k rejekci štěpu a jsou v nich zahrnuty jak složky vrozené, tak adaptivní imunity. Tyto transplantační reakce neboli rejekce zahrnují T-buněčnou cytotoxicitu, aktivaci granulocytů pomocí Th1 a Th2 cytokinů, aktivaci NK (Natural killer) buněk, produkci aloprotilátek a aktivaci komplementu (Le Moine et al., 2002).



Obr. 5: Schematické znázornění aktivace efektorových mechanismů způsobující poškození štěpu.

CD4⁺ T lymfocyty se pod vlivem cytokinů diferencují na Th1 a Th2 lymfocyty. Th1 lymfocyty produkují interleukin-2 (IL-2) a tím pomáhají CD8⁺ T lymfocytům, které rozpoznávají HLA I na APC dárce, stávají se z nich aktivované cytotoxické T lymfocyty (CTL) a působí cytotoxicky na buňky štěpu (perforin/granzym, Fas ligand (FasL), lymfotoxin). Th1 lymfocyty (CD4⁺) dále produkují IFN-γ, který aktivuje makrofágy. Th1 lymfocyty mohou také působit cytotoxicky expresí FasL na svém povrchu, stejně jako CTL lymfocyty. Th2 lymfocyty produkují IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 a IL-13, což vede k aktivaci eosinofilů a poskytují pomoc B lymfocytům. B lymfocyty poté produkují aloprotilátky, které mohou mimo jiné aktivovat komplement a protilátkami zprostředkovanou buněčnou cytotoxicitu (ADCC). (Převzato a upraveno z Le Moine et al., 2002).

Rejekce se dělí na základě zúčastněných efektorových mechanismů na rejekci celulární a protilátkami-zprostředkovanou (humorální). Dále se dělí dle doby vzniku uplynulé od transplantace na hyperakutní, akutní a chronickou. Celulární rejekce je způsobena T lymfocyty a rejekce humorální je zprostředkována protilátkami namířenými proti neshodným antigenům dárce orgánu.

Na vzniku rejekce se podílejí rizikové faktory imunologického i neimunologického původu (viz Tabulka 1).

Tabulka 1: Přehled imunologických a neimunologických faktorů hrající roli při vzniku rejekce (převzato a upraveno z Viklický et al., 2008).

Imunologické	
Neshody v HLA antigenech	DR>B>A>C
Senzitizace (protilátky) proti HLA antigenům	Předchozí transplantace
	Těhotenství
	Transfúze
Infekce – pyelonefritida, chřipka atd.	
Neimunologické	
Opožděný rozvoj funkce štěpu (ATN)	
Orgán od zemřelého dárce, dárcovství od ženy	
Rasa příjemce a dárce – černoši, Asiati, Hispánci	

2.2.1 Celulární rejekce

Celulární rejekce je zprostředkována převážně T lymfocyty a to jak CD4+, tak CD8+ T lymfocyty.

Cytotoxické T lymfocyty (CTL, CD8+) aktivované přímým rozpoznáním HLA I molekul na povrchu štěpu jsou aktivovány za pomoci CD4+ T lymfocytů (produkce interleukinu-2, IL-2) a cytotoxicky zabíjejí buňky štěpu třemi mechanismy. CD8+ T lymfocyty aktivované skrze nepřímé rozpoznání nejsou schopny zabíjet buňky štěpu. Prvním z těchto mechanismů je interakce Fas receptoru a jeho ligandu (FasL). CTL mají na svém povrchu vysoce exprimovaný FasL, který se váže na Fas receptor přítomný na povrchu velkého množství různých buněk. Tato interakce vede ke spuštění programované buněčné smrti (apoptózy) v cílové buňce (Kägi et al., 1996). Dále má CTL v cytoplazmě cytotoxické granule obsahující perforin a granzymy A a B. Po rozpoznání cílové buňky dojde k migraci granul k plazmatické membráně a vylití jejich obsahu v místě buněčného kontaktu. Proteáza zvaná perforin tvoří v membráně cílové buňky póry, kterými se do buňky dostanou granzymy. Jejich působením jsou v cytoplazmě cílové buňky

štěpeny kaspázy, čímž je aktivována kaskáda reakcí vedoucí k apoptóze. (Shresta et al., 1998). Třetím cytotoxickým mechanismem CTL je sekrece lymfotoxinu (LT, Tumour necrosis factor - TNF- β), který stejně jako FasL indukuje apoptózu. U tohoto mechanismu nedochází ke kontaktu s cílovou buňkou (Schmid et al., 1986).

Pomocné T lymfocyty (Th, CD4+) se po přímém i nepřímém rozpoznání HLA II molekul diferencují působením cytokinů na podtypy Th1, Th2, Th3, Th17 a T regulační lymfocyty. Th1 lymfocyty (tzv. zánětlivé lymfocyty) se diferencují po setkání s antigenem v přítomnosti cytokinu IL-12 a produkují hlavně IFN- γ , TNF- α a IL-2. IFN- γ aktivuje makrofágy (MF) k produkci oxidu dusnatého, reaktivních kyslíkových radikálů ad. Ve tkáni štěpu způsobují Th1 a makrofágy přecitlivělost oddáleného typu. Diferenciace v Th2 podtyp lymfocytů po setkání s antigenem je způsobena cytokinem IL-4. Th2 produkují cytokiny IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13. Produkci IL-4, IL-5 a IL-13 rekrutují a aktivují eosinofily do štěpu, kde uvolňují granule s enzymy poškozující štěp (Martinez et al., 1993). Th2 lymfocyty také napomáhají B lymfocytům k produkci protilátek, které se účastní humorální rejekce.

2.2.2 Rejekce zprostředkovaná protilátkami

2.2.2.1 Hyperakutní rejekce

Během několika málo minut až hodin po transplantaci (obvykle do 48 h) se může vyskytnout hyperakutní rejekce. Ta je způsobena vysokou hladinou předem vytvořených protilátek (preformovaných) u příjemce orgánu (ledviny). Preformované protilátky se vážou na endotelové buňky štěpu a aktivují koagulační, komplementovou a kininovou kaskádu, což vede k intravaskulární trombóze, ischemii a následné nekróze. Jejich přítomnost je z 99 % zapříčiněna dřívější imunizací příjemce, jako je krevní transfuze, těhotenství, předchozí transplantace. U 1 % pacientů není známá příčina existence preformovaných protilátek (Afzali et al., 2007). Hyperakutní rejekce je také spojována s výskytem neutrofilů a krevních destiček v glomerulárních a peritubulárních kapilárách (Racusen & Haas, 2006).

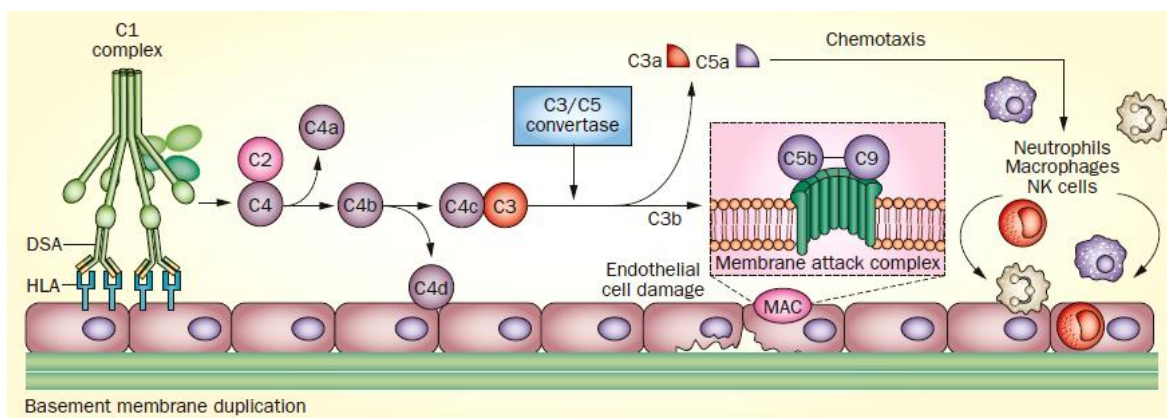
Hyperakutní rejekce se dnes téměř nevyskytují z důvodu provádění předtransplantačních testů ke zjištění přítomnosti donor-specifických protilátek (DSA) pomocí komplement-dependentního cytotoxického testu (CDC test) a dalších citlivých testů pevné fáze (Solid phase assay).

2.2.2.2 Akutní humorální rejekce

Akutní humorální rejekce je způsobena donor-specifickými protilátkami proti neshodným antigenům dárce (převážně HLA). Je to závažná imunologická komplikace, která se obtížně léčí a nejčastěji vzniká do 2–3 týdnů po transplantaci.

Tvorba aloprotilátek probíhá za pomoci $CD4^+$ T lymfocytů. $CD4^+$ T lymfocyty mohou být aktivovány jak přímým rozpoznáním antigenu na APC dárce, tak i nepřímým rozpoznáním. Avšak pouze $CD4^+$ T lymfocyty, které byly aktivovány nepřímým rozpoznáním, mohou poskytnout náležitou pomoc B lymfocytům k produkci aloprotilátek. B lymfocyt rozpozná povrchovým imunoglobulinem cizí HLA molekulu dárce, kterou následně zpracují. Malý fragment této molekuly je vystaven na HLA II na povrchu B lymfocytu, kterou rozpoznává $CD4^+$ T lymfocyt svým TCR za účasti kostimulačních a adhezivních molekul. Následně se B lymfocyt dělí, diferencuje a produkuje aloprotilátky (IgM, IgG2, IgG3 ad.), (Steele et al., 1996).

Vzniklé protilátky mohou štěp poškozovat různými způsoby. Prvním a velmi důležitým způsobem je aktivace klasické dráhy komplementu, kdy se na protilátky navázané na endotelu štěpu váže protein C1, který změní svou konformaci a získává proteolytickou aktivitu. Tím se spouští kaskáda dějů vedoucích až k aktivaci MAC komplexu (Membrane attack complex). Ten tvoří póry v membráně buňky, dochází tak k porušení osmotické rovnováhy a lýze buňky. V klasické komplementové kaskádě vzniká štěpný produkt C4d, který se usazuje v kapilárách štěpu a slouží jako marker humorální rejekce (viz Obr. 6), (Murata & Baldwin, 2009, Stegall et al., 2012).



Obr. 6: Aktivace komplementu donor-specifickými protilátkami vedoucí k poškození štěpu a infiltraci neutrofilů, makrofágů (MF) a NK buněk (Převzato z Stegall et al., 2012).

Přestože C4d není ve všech případech detekováno, mají pacienti příznaky humorální rejekce a vyskytují se u nich DSA. Tento stav se nazývá C4d negativní protilátkami-zprostředkovaná rejekce (Hirohashi et al., 2010). U tohoto typu rejekce se uplatňují další mechanismy poškození štěpu, jako je například buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC), kde hlavní roli hrají NK buňky. Ty se vážou svým Fcγ receptorem na buňky, které jsou opsonizovány IgG1 a IgG3. Tato interakce spouští vylití cytotoxických granul (perforin + granzym) NK buněk (Seidel et al., 2013). Dále také dochází k aktivaci MF, neutrofilů a eosinofilů (Afzali et al., 2007). C4d negativní humorální rejekce se vyskytuje také v případě přítomnosti protilátek namířených proti non-HLA antigenům (Colvin & Smith, 2005).

2.2.3 Chronická rejekce

Chronická rejekce se vyskytuje delší dobu po transplantaci (měsíce až roky) a je způsobena mnoha různými faktory, imunologickými i neimunologickými. Podílejí se na ní celulární i humorální složky imunitního systému.

Může mít za následek až úplnou ztrátu funkce štěpu a u transplantace ledvin se označuje jako chronická nefropatie štěpu. Dochází při ní k duplikaci bazální membrány glomerulů a peritubulárních kapilár a k intersticiální fibróze. Dále se u pacientů projevuje proteinurií, dalšími příznaky poškození funkce ledviny a později ztrátou funkce štěpu (Puttarajappa et al., 2012).

2.3 B lymfocyty a rejekce

Z hlediska „efektorových“ mechanismů se rejekce dělí na humorální a celulární, jak bylo uvedeno výše. Avšak oba typy rejekce mohou probíhat současně, kdy štěp infiltrují T lymfocyty, B lymfocyty, makrofágy, NK buňky a eosinofily příjemce. B lymfocyty produkcí protilátek, prozánětlivých cytokinů a chemokinů hrají důležitou roli při humorální, ale i celulární rejekci (Zarkhin et al., 2010). V současné době je humorální rejekce velkým rizikem pro selhání transplantovaných orgánů. Stále se hledají lepší možnosti, jak zlepšit včasnou diagnostiku a účinně potlačit humorální odpověď proti antigenům dárce (Stegall et al., 2014).

2.3.1 Vývoj B lymfocytů

B lymfocyty vznikají z lymfoidní linie hematopoetických kmenových buněk. Vývoj z kmenové buňky až po nezralý B lymfocyt probíhá v kostní dřeni a je závislý na kontaktu se stromálními buňkami kostní dřene (vazba na receptor růstového faktoru kmenových buněk), které produkují IL-7 a na působení několika transkripčních faktorů (IKAROS, E2A, EBF ad.) pro diferenciaci B buněk (Brown et al., 2007, Allman & Miller, 2003). Nejprve u progenitoru B lymfocytu (pro-B) dochází k přeskupení genů těžkého a poté lehkého řetězce imunoglobulinu, kdy u těžkého řetězce probíhá V-D-J přeskupení¹ a u lehkého dochází k V-J přeskupení² (Lewis & Wu, 1997, Bassing et al., 2002). Poté dochází k přepisu genu do mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina) a k vystřížení intronů z primárního transkriptu. Pokud je buňka schopna správně vytvořit a exprimovat na svém povrchu imunoglobuliny IgM a IgD, stává se z ní nezralá B buňka a migruje do sekundárních lymfatických orgánů (slezina, lymfatické uzliny, Peyerovy pláty, mukózní tkáň, mandle). Tam se nezralé B buňky diferencují na folikulární B lymfocyty a B lymfocyty marginální zóny (MZ), (Ruddle & Akirav, 2009, Zotos & Tarlinton, 2012).

¹ V-D-J přeskupení – Vyštěpení úseků DNA (deoxyribonukleová kyselina) mezi genovými segmenty na chromozomu 14 v genovém komplexu kódující H řetězec (těžký řetězec imunoglobulinů). Na 5'-konci tohoto komplexu se nachází skupina genových úseků V (variability), dále skupina úseků D (diversity), krátké úseky J (joining) a na 3'-konci celého genového komplexu se nachází genové úseky konstantní (C) části imunoglobulinu.

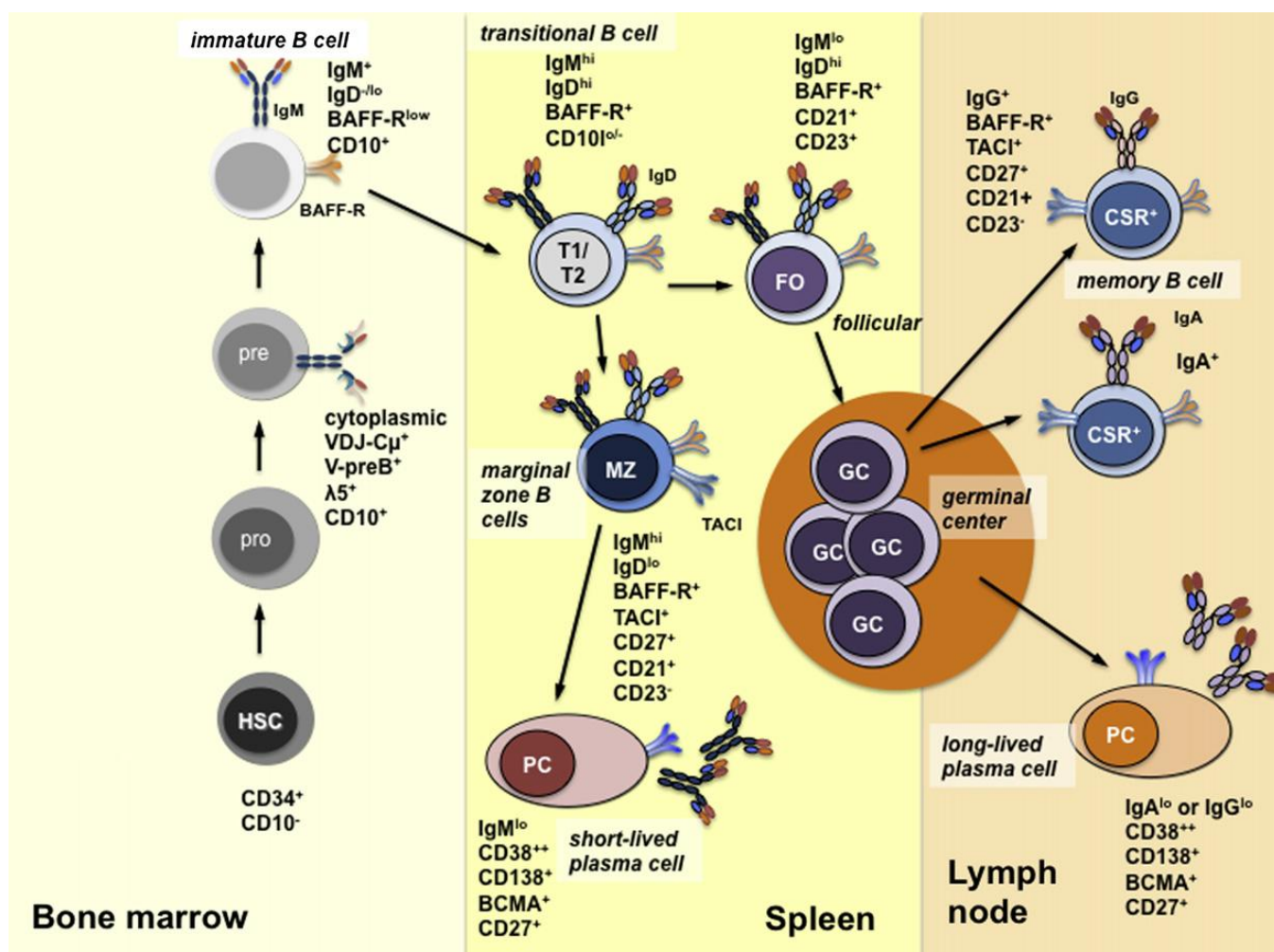
² V-J přeskupení – Probíhá obdobně jako u H řetězce akorát s tím rozdílem, že v genovém komplexu pro L řetězec (lehký řetězec imunoglobulinů) neobsahuje genové úseky D (diversity).

Do sleziny vstupují B buňky v přechodném stavu, tzv. T1 buňky, které se dále vyvíjejí do přechodného stavu T2. Ve stádiu T1 dochází k negativní selekci autoreaktivních B buněk, které po setkání s antigenem dostanou skrze svůj B buněčný receptor (BCR) signál k apoptóze, anergii nebo k editaci receptoru (Melamed et al., 1998, Pewzner-Jung et al., 1998, Prak et al., 2011). Pokud však buňka váže antigen s nízkou afinitou, obdrží signál k přechodu do stádia T2. K úspěšnému přechodu T1 B buněk do T2 B buněk je vyžadována signalizace skrze receptor B buněčného aktivačního faktoru (BAFF-R), který váže BAFF cytokin. Dále se T2 buňky vyvíjejí buď v cirkulující lymfocyty (folikulární B lymfocyty), nebo v necirkulující lymfocyty (B lymfocyty marginální zóny). Při diferenciaci T2 buněk v B buňky MZ dochází ke vzniku třetího přechodného stádia, tzv. T2-preMZ, který se někdy označuje jako T3 typ (Palanichamy et al., 2010). B buňky MZ a folikulární B buňky jsou schopné produkovat pouze povrchové imunoglobuliny izotypu IgM a IgD. Až po setkání s antigenem se diferencují v plazmatické buňky produkující protilátky, nebo v paměťové B lymfocyty (Stegall et al., 2014).

Aktivace B lymfocytů po setkání s antigenem může být buď nezávislá, nebo závislá na T lymfocytech. U nezávislé odpovědi na T lymfocytech se B lymfocyty aktivují přímo po navázání antigenu na BCR bez pomoci T lymfocytů. T-nezávislé protilátkové odpovědi se převážně účastní B buňky MZ, které se diferencují v plazmablasty produkující nízkoafinní IgM protilátky (Vos et al., 2000, Tobón et al., 2013).

Většina B lymfocytů (folikulární B lymfocyty) je aktivována za pomoci T lymfocytů (CD4+), kdy dochází k produkci vysokoafinních protilátek různých izotypů. Než se naivní B buňka setká s antigenem, cirkuluje ve folikulech periferních lymfoidních orgánů. Po setkání s antigenem nejprve dochází k pohlcení antigenu B buňkou, která ho zpracuje a prezentuje na svém povrchu T buňkám. V lymfoidních orgánech existují specializované T lymfocyty a dendritické buňky (folikulární dendritické buňky), které spolu s folikulárními B lymfocyty tvoří germinální centra³. V germinálním centru probíhá somatická mutace, selekce vysokoafinních buněk a izotypový přesmyk. Z B buněk se tak stávají dlouho žijící paměťové B buňky a plazmatické buňky, které produkují vysokoafinní protilátky (viz Obr. 7), (Stegall et al., 2014).

³ Germinální centrum – Specializovaný útvar uvnitř lymfatických orgánů, který se tvoří během T-závislé humorální odpovědi.



Obr. 7: Schematické znázornění vývoje B lymfocytů.

V kostní dřeni probíhá vývoj B lymfocytu z hematopoetické kmenové buňky. V pro-B lymfocytu začíná přeskupování genů H řetězce (V-D-J přeskupení), po úspěšném přeskupení se stává z pro-B lymfocytu pre-B lymfocyt a dochází k přeskupení genů L řetězce (V-J přeskupení). Expresí povrchového imunoglobulinu (IgM, IgD) lymfocyt migruje do sleziny, kam vstupuje jako T1 B lymfocyt, prochází skrze vývojová stádia T2 nebo T2-MZ (T3) až se z něj stane buď folikulární B lymfocyt, nebo B lymfocyt marginální zóny. Po setkání s antigenem se z B buňky marginální zóny vyvine krátce-žijící plazmatická buňka a z folikulárních B buněk v germinálním centru vznikne paměťová B buňka nebo dlouze-žijící plazmatická buňka. (Převzato a upraveno z Pieper et al., 2013.)

2.3.1.1 B-cell activating factor (BAFF)

B-buněčný aktivační faktor (BAFF), znám také jako BLys, TALL-1, zTNF4, THANK, TNFSF13 a CD257, je homotrimer patřící do TNF superrodiny. Je to cytokin, který podporuje maturaci, přežití a aktivaci B Lymfocytů (Schneider et al., 1999, Mukhopadhyay et al., 1999, Mackay & Ambrose, 2003).

BAFF se váže na tři receptory, mezi které patří TACI (Transmembrane activator and calcium modulator), BAFF-R (BR3) a BCMA (B-cell maturation antigen), (Thompson et al., 2001, Gross et al., 2000). Všechny tyto tři receptory jsou exprimovány na B lymfocytech a jejich míra exprese se mění v závislosti na úrovni maturace těchto buněk. BAFF-R a TACI se mohou vyskytovat i na některých populacích T lymfocytů (Gross et al., 2000, Chu et al., 2007). BAFF-R je velmi důležitý při regulaci přežití a vývoje B buněk ve slezině. Receptor BCMA je více exprimován na plazmatických buňkách a plazmablastech a podporuje tak jejich přežití. Naopak TACI je negativní regulátor homeostaze B buněk, je exprimován hlavně na povrchu některých B buněk v přechodném stádiu ve slezině a zralých B buněk, avšak jeho exprese je celkově nižší než exprese BAFF-R (Thompson et al., 2001, Seshasayee et al., 2003, Shulga-morskaya et al., 2004, O'Connor et al., 2004).

Receptory TACI a BMCA vážou také APRIL (A proliferation-inducing ligand), který patří taktéž do TNF superrodiny. APRIL je nejbližším příbuzným BAFF cytokinu, shodují se v jedné třetině své aminokyselinové sekvence. APRIL stimuluje proliferaci, sekreci imunoglobulinů a izotypový přesmyk u B lymfocytů (Hahne et al., 1998, Marsters et al., 2000).

BAFF cytokin je produkován mnoha rozdílnými buňkami, hlavními producenti jsou monocyty, makrofágy, dendritické buňky a neutrofily, dále je exprimován také některými subpopulacemi T a B lymfocytů. Jeho exprese je umocněna cytokiny IFN- α , IFN- γ , IL-10 a růstovými faktory (Nardelli et al., 2001, Scapini et al., 2003). BAFF existuje ve dvou formách, jako transmembránový protein typu II a jako solubilní trimer (BAFF-s), který vzniká proteolytickým štěpením membránově vázané formy (Schneider et al., 1999). BAFF nevyžadují B buňky v kostní dřeni, ale jakmile se B buňky dostanou do sleziny a započnou jejich maturaci, B buňky v T1 stádiu zvýší expresi BAFF-R, tudíž i T2 B buňky vykazují vysokou expresi BAFF-R. Pokud by T1 B buňky nedostaly signál skrze BAFF-R s navázaným BAFF cytokinem, nedošlo by k dalšímu vývoji B buněk a v celém repertoáru B buněk, by chyběly folikulární B lymfocyty a B lymfocyty MZ, tudíž by byla porušena humorální imunitní odpověď (Schiemann et al., 2001, Khan, 2009). Dále se BAFF podílí na Th1 a Th2 imunitní odpovědi. BAFF poskytuje kostimulační signály T buňkám a zvyšuje, tak jejich proliferaci a produkci cytokinů (např. IL-5, IL-13), (Huard et al., 2001, Sutherland et al., 2005).

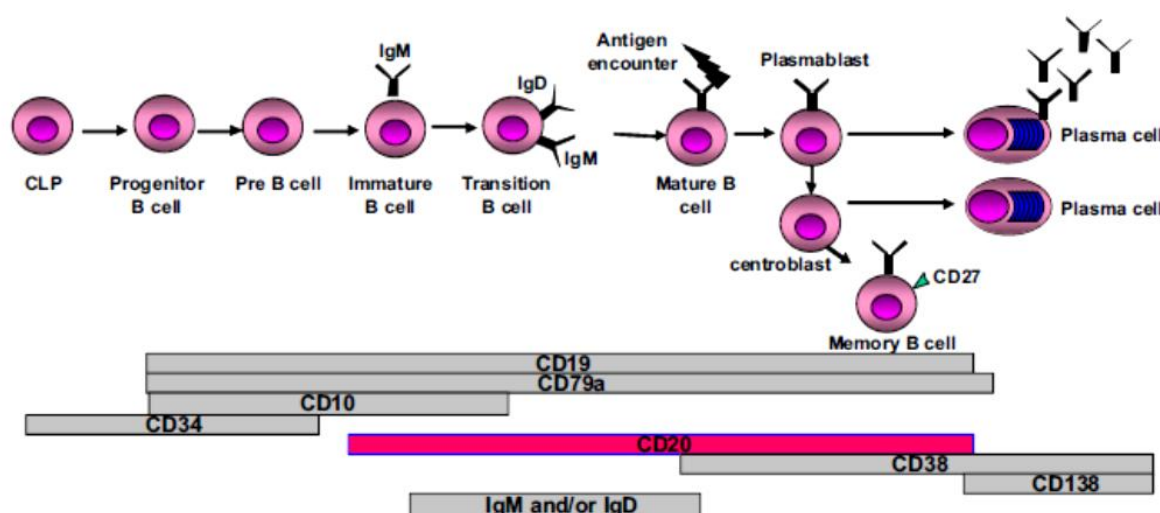
Ačkoliv je BAFF jedním z nejdůležitějších faktorů v B buněčné maturaci, proliferaci a přežití, jeho nadměrná produkce způsobuje vznik různých autoimunitních

chorob a imunodeficiencí, jakou jsou systémový lupus erythematosus, B buněčná hyperplazie, hyperagmaglobulinémie, Sjögrenův syndrom a revmatoidní artritida (Zhang et al., 2001, Mariette et al., 2003, Ota et al., 2010).

BAFF cytokin pravděpodobně hraje roli při transplantacích ledvin. BAFF by mohl být rizikovým faktorem při rozvoji dysfunkce štěpu ledviny a zároveň při tvorbě donor-specifických protilátek (Thibault-Espitia et al., 2012). Rizikový pacienti, kteří podstoupili nekompatibilní transplantaci ledviny, vykazovali vyšší koncentraci BAFF cytokinu a bylo u nich pozorováno zvýšené riziko vzniku protilátkami zprostředkované rejekce (Banham et al., 2013). Byla rovněž zjištěna pozitivní korelace mezi hladinou anti-HLA protilátek a koncentrací BAFF cytokinu v séru, nicméně nebyla nalezena souvislost mezi koncentrací BAFF cytokinu v séru před transplantací a rozvojem protilátkami zprostředkované rejekce (Snanoudj et al., 2014).

2.3.1.2 Dlouho žijící plazmatické buňky

Dlouho žijící plazmatické buňky se v perifériích téměř nevyskytují a v kostní dřeni tvoří pouze 0,5% jaderných buněk. Jsou to nedělící se, terminálně diferenciované buňky a na svém povrchu exprimují molekuly CD38 a CD138 (viz Obr. 8). Od ostatních typů B buněk se liší ztrátou exprese povrchových imunoglobulinů, a dále neexprimují molekuly CD20, CD19 a CD27. Jejich funkcí je pouze produkce velkého množství vysokoafinních protilátek. Produkované protilátky proti některým antigenům (např. protilátky proti HLA) jsou udržovány i několik let ve stálé hladině (Slifka & Ahmed, 1998, Manz et al., 2002).



Obr. 8: Maturace B lymfocytů a znázornění změny exprese povrchových molekul v různých vývojových stádiích (Převzato z Small et al., 2009).

Po fázi vývoje v lymfoidních orgánech část B lymfocytů zůstává zde a část putuje do kostní dřeně, kde se podílí na hladině protilátek v krvi. Ve správném mikroprostředí v kostní dřeni mohou přetrvávat velmi dlouhou dobu a mechanismus jejich smrti není zcela objasněn. Ke svému přežití nejspíše vyžadují pomocné buňky, které produkují faktory přežití (IL-6, BAFF, APRIL), (Tangye, 2011). Zdá se však, že stálá produkce protilátek těmito dlouho žijícími plazmatickými buňkami je ovlivněna regulací stromálními buňkami (Stegall et al., 2014).

Výskyt CD38+ plazmablastů koreluje s cirkulujícími DSA a také s výskytem C4d ve štěpu (Zarkhin et al., 2008).

2.3.1.3 Paměťové B lymfocyty

Paměťové B buňky ve své podstatě neprodukují protilátky, ale po setkání s antigenem reagují mnohem rychleji, než naivní buňky a mohou se přeměnit na plazmatické buňky. Uvádí se, že tvoří přibližně 25 % B buněk v periferní krvi a přežívají velmi dlouho (Maurer et al., 1990). Na svém povrchu exprimují molekuly CD20 a CD27, dále také exprimují IgA, IgM a IgG. Molekula CD27 je univerzální marker paměťových buněk (Avery et al., 2005).

Po transplantaci jsou paměťové buňky zodpovědné za zvýšení hladiny DSA v séru u předem senzitizedovaných pacientů, což vede k vývoji protilátkami-zprostředkované rejekce (Burns et al., 2008). Existují údaje v literatuře, že paměťové buňky se mohou podílet na vývoji celulární rejekce. V tomto případě paměťové buňky slouží jako antigen-prezentující buňky a prezentují donor-specifické HLA antigeny T lymfocytům příjemce. Předpokládá se, že přítomnost CD20+ buněk zhoršuje celkové přežití štěpu (Zarkhin et al., 2008).

2.3.1.4 HLA protilátky

Jak bylo výše uvedeno, preformované HLA protilátky proti neshodným antigenům dárce jsou příčinou hyperakutní rejekce, kdy je štěp nenávratně odhojen takřka okamžitě po transplantaci (Patel & Terasaki, 1969). HLA protilátky se ale také podílejí na vývoji protilátkami-zprostředkované rejekci v časném potransplantačním období. V případě komplement-aktivujících protilátek, incidence protilátek koreluje s nálezem C4d komponenty v peritubulárních kapilárách transplantované ledviny (Lederer et al., 2001). Asociace přítomnosti protilátek s přítomností C4d komponenty jak u časného, tak i pozdního selhání štěpu byla rovněž prokázána (Collins et al., 1999, Nicleleit et al., 2002,

Mauiyyedi et al., 2001, Regele et al., 2001, Mauiyyedi & Colvin, 2002, Mauiyyedi et al., 2002). S tím souvisí i zjištění, že HLA protilátky (HLA I i HLA II) jsou přítomné téměř ve všech případech ztráty funkce štěpu z imunologických příčin (El-Awar et al., 2002).

Vedle HLA-specifických protilátek existují také protilátky s odlišnou specificitou, které se účastní rejekce. Ty mohou být namířené proti non-HLA antigenům a výjimečně proti vedlejším histokompatibilním antigenům⁴ (viz Tabulka 2).

Detekce protilátek se provádí pomocí různých testů, jako jsou například ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), FCXM (křížová zkouška průtokovou cytometrií), CDC (komplement-dependentní cytotoxický test) a xMAP technologie (Luminex).

Tabulka 2: Možné cílové antigeny protilátkové imunitní odpovědi. (Převzato a upraveno z Slavcev & Dyer, 2009)

HLA antigeny	I. třída (všechny jaderné buňky)
	II. třída (antigen prezentující buňky, aktivované T lymfocyty, etc.)
Non-HLA antigeny	ABO antigeny (erytrocyty, endoteliální buňky)
	MICA, MICB (endoteliální buňky, keratinocyty, fibroblasty, monocyty, etc.)
	Vimentin (cytoskelet)
	Receptor typu I pro Angiotensin II (AT ₁) (cévy, mozek, srdce, ledviny, etc.)
	Tkáňově-specifické antigeny (ledviny, srdce, játra, etc.)
Vedlejší histokompatibilní antigeny	Peptidy prezentované na HLA molekulách

⁴ Minor histocompatibility antigen – Polymorfní proteiny (lišící se od MHC), které jsou prezentovány MHC molekulami I. a II. třídy.

3 Cíle diplomové práce

Předložená diplomová práce se zabývá charakterizací B buněčné odpovědi hodnocením rizika vývoje akutní protilátkami zprostředkované rejekce u pacientů po transplantaci ledviny.

Cíle diplomové práce:

1. Porovnat hladiny BAFF cytokinu v séru před transplantací u skupiny pacientů s humorální rejekcí s kontrolní skupinou pacientů bez rejekce. Stanovit, zda by měření koncentrace BAFF před transplantací mohlo přispět k určení prognózy štěpu ledviny po transplantaci.
2. Porovnat hladiny BAFF cytokinu po transplantaci ledviny u skupiny pacientů s humorální rejekcí s kontrolní skupinou pacientů bez rejekce. Určit zda by se hladiny BAFF nemohly používat jako užitečný marker humorální rejekce.
3. Zavést metodiku B-ELISpot na oddělení imunogenetiky IKEM.
4. Předběžně zhodnotit klinický význam metody B-ELISpot pro predikci vývoje humorální rejekce po transplantaci ledvin a přispět tak ke stratifikaci pacientů do skupin s nízkým a vysokým rizikem rejekce po transplantaci.

4 Experimentální část

4.1 Schéma experimentů

4.1.1 Experiment 1 – BAFF cytokin

Do studie bylo zařazeno celkem 36 pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze v letech 2004 – 2005 a v letech 2009 – 2013. U 17 pacientů z let 2004 – 2005 nebyla zjištěna žádná rejekční epizoda po dobu 10 let od transplantace. Tito pacienti měli zároveň okamžitý rozvoj funkce štěpu. U 19 pacientů transplantovaných v letech 2009 - 2013 byla diagnostikována protilátkami-zprostředkovaná rejekce do 2 měsíců po transplantaci ledviny a celkový stav pacientů byl sledován 1 rok po transplantaci. Z celkového počtu 36 příjemců bylo 5 transplantovaných ledvin od žijícího dárce a 31 od kadaverózního dárce.

Před transplantací byla u všech příjemců (PCR-SSOP⁵) i dárců (PCR-SSP⁶) provedena typizace HLA antigenů. Pomocí komplement-dependentního cytotoxického testu (CDC testu) a křížové zkoušky průtokovou cytometrií (FCXM) byla u pacientů zjišťována přítomnost donor-specifických protilátek (DSA). U rizikových pacientů byla stanovena hladina a specificita DSA pomocí metody Luminex (LABScreen Mix a Luminex LABScreen Single antigen I. a II. třídy). Všechny tyto testy se prováděly v rámci rutinních vyšetření před transplantací. Lymfocyty pro CDC a FCXM test byly u živých dárců izolovány z nesrážlivé krve a u kadaverózních dárců ze sleziny nebo uzliny. DNA pro typizaci HLA antigenů byla izolována z periferní nesrážlivé krve.

K stanovení koncentrace BAFF cytokinu byla získána séra z periferní krve pacientů, která byla odebrána 0 – 21 dní před transplantací. U pacientů bez rejekce byla další měření provedena na sérech odebraných 3 měsíce po transplantaci, zatímco u pacientů s humorální rejekcí byla séra odebrána v době rejekce (0 – 1,5 měsíce po transplantaci). Všechny vzorky sér byly získány ze srážlivé krve pacienta.

Cytokin BAFF se v těle vyskytuje buď v solubilní formě nebo ve formě vázané na membránu. V našem experimentu zkoumáme pouze solubilní frakci cytokinu BAFF.

⁵ PCR-SSOP – polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami

⁶ PCR-SSP – polymerázová řetězová reakce se sekvenčně specifickými primery

4.1.2 Experiment 2 – IgG Enzyme-linked Immunosorbent spot assay (ELISpot)

(Experimentální) Soubor tvořilo 37 pacientů, kteří v letech 2010 – 2012 podstoupili transplantaci ledviny od živého dárce v IKEM.

Před transplantací byla v rámci rutinního vyšetření provedena typizace HLA antigenů (viz výše). Přítomnost panel-reaktivních protilátek (PRA) byla zjištěna CDC testem a přítomnost DSA pomocí FCXM. V případě přítomnosti protilátek se jejich hladina a specifita stanovila pomocí metody Luminex (LABScreen Mix a Luminex LABScreen Single antigen I. a II. třídy). Lymfocyty i DNA byly izolovány stejně jako u předchozího pokusu.

Pro metodu ELISpot byly z periferní nesrážlivé krve příjemců (odebráno 0 – 310 dní před transplantací ledviny) i dárců byly izolovány mononukleární buňky (PBMC). Ty byly před dalším použitím zmrazeny (viz kapitola XY) a uloženy v kapalném dusíku. Metodou IgG ELISpot byl stanovován počet aloreaktivních B lymfocytů produkujících protilátky IgG po (donor-specifické) stimulaci ve smíšených lymfocytárních kulturách.

Na základě laboratorních vyšetření (koncentrace sérového kreatininu aj.) v případě zhoršení funkce štěpu a jeho následného histologického vyšetření byla u pacientů provedena diagnostika akutní humorální a celulární rejekce. Celkové přežívání štěpů bylo sledováno po dobu 1 roku po transplantaci.

4.2 Použité přístroje a chemikálie

4.2.1 Přístroje, materiál

- Analyzátor buněk CEDEX XS, INNOVATIS, Roche (Cedex XS Smart Hide)
- BIOREADER®-6000-Eα, BIOSYS
- Centrifuga Thermo CL30, Trigon plus
- Centrifuga Megafuge 1.ORS, Heraeus Instruments
- Centrifuga Minispin+, Eppendorf
- Inkubátor s vodním pláštěm Queue Systems Inc.
- Laminární box s UV lampou, Heraeus Instruments
- Luminex 200 IS 2.3, One Lambda
- Vakuová odsávačka MADA VAC II No. 178, MadaMedical
- Vodní lázeň Julabo U3
- Třepačka ZX3, Velp Scientifica
- Zamrazovač IceCube 1810, SY-LAB
- Zkumavky, pipety, špičky a běžný laboratorní materiál

4.2.2 Chemikálie

- DMSO (Dimethylsulfoxid), Sigma
- Fetální hovězí sérum (FCS), GE Healthcare
- Ficoll-Paque™ PLUS solution, GE Healthcare
- Fosfátový pufr (PBS), pH 7,2–7,4
- LABScreen® Single Antigen Class I, One Lambda
- Médium IMDM, GE Healthcare
- Médium RPMI 1640 s L-Glutaminem a fenolovou červení, GE Healthcare
- Mitomycin C (*Streptomyces caespitosus*), Sigma
- Penicilin-Streptomycin, Sigma

- Sada ELISpot^{PLUS} pro lidský IgG, MABTECH
 - Monoklonální protilátka MT91/145
 - Biotinylovaná monoklonální protilátka MT78/145
 - Streptavidin – Alkalická fosfatáza
 - Polyklonální aktivátor R848
 - Lyofilizovaný rekombinantní lidský IL-2
 - ELISpot destičky
 - Substrát BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium chloride)
- Sada Luminex[®] Performance Assay – Human Biomarker Base Kit A, R&D Systems
 - Standard Cocktail
 - Diluent RD2-5
 - Calibrator Diluent RD60-6
 - Streptavidin – fykoerytrin (PE)
 - Koncentrovaný promývací pufr
 - 96-jamková destička, lahvička na míchání, lepicí fólie
 - Mikrokuličky s navázanou protilátkou proti BAFF
 - Biotinylovaná detekční protilátka
- Trypanová modř 0,3% roztok, Lékárna IKEM

4.3 Metody

4.3.1 Xmap metodika (Luminex)

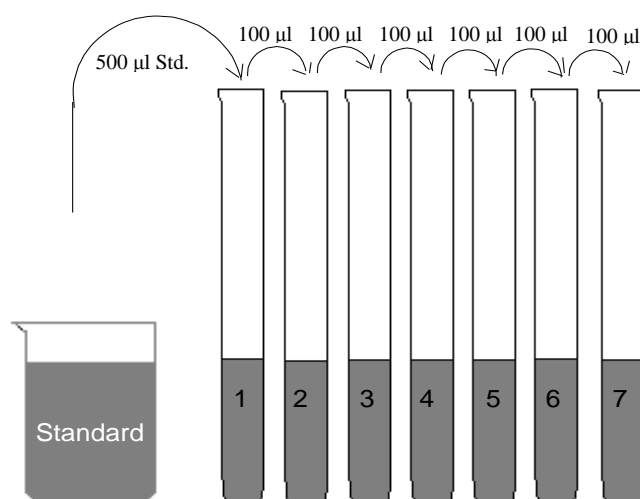
Hladina BAFF cytokinu v séru byla stanovována Xmap metodikou pomocí přístroje Luminex.

Příprava vzorků

Séra vybraných pacientů byla rozmražena a centrifugována 10 min (14000 g). Poté bylo odebráno 50 μ l čistého supernatantu, přeneseno do zkumavky, kam bylo pipetováno 100 μ l Calibrator Diluent RD6-60.

Příprava reagensí

Koncentrovaný promývací pufr (20 ml) byl zředěn destilovanou vodou na celkový objem 500 ml. Standardy byly získány rozpuštěním Standard Cocktail v 1 ml Calibrator Diluent RD6-60. Dále bylo do šesti zkumavek pipetováno 200 μ l Calibrator Diluent RD6-60. Pomocí ředící řady bylo připraveno celkem 7 standardů. Dále použijeme trojitou ředící řadu k přípravě zbývajících standardů dle schématu níže (viz Obr. 9). Testovací mikropartikel s navázanou protilátkou proti BAFF cytokinu byly centrifugovány (30 s, 1000 g), opatrně vortexovány a naředěny požadovaným objemem roztoku Diluent RD2-5 (na 96 jamek: 50 μ l kuliček + 5 ml Diluent RD2-5).



Obr. 9: Schematické znázornění přípravy standardů. (Převzato a upraveno z manuálu Human Biomarker Base Kit A, R&D Systems).

Měření

96-jamková destička byla navlhčena promývacím pufrem (100 μ l/jamku) a ten byl odsán vakuovou odsávacíčkou. Poté bylo pipetováno 50 μ l vzorku (nebo standardu) na jamku a 50 μ l naředěných kuliček na jamku. Destička přikryta fólií se inkubovala 3 h při laboratorní teplotě a mírném třepání na třepačce. Mezitím byla připravena detekční protilátka s navázaným biotinem. Ampulka se zmíněnou protilátkou byla centrifugována, mírně zvortexována a naředěna roztokem Diluent RD2-5 (50 μ l protilátky + 5 ml Diluent RD2-5).

Po inkubaci byla z destičky odstraněna veškerá tekutina vakuovou odsávacíčkou. Destička byla třikrát promyta přidáním 100 μ l promývacího pufru do každé jamky, který byl opětovně odsán. Potom bylo do každé jamky přidáno 50 μ l připravené detekční protilátky s navázaným biotinem. Přikrytá destička byla opět za mírného třepání inkubována 1 h při laboratorní teplotě.

V dalším kroku byl připraven Streptavidin-PE, centrifugací (30s, 1000 g), jemným zvortexováním a zředěním (55 μ l Streptavidinu-PE do 5,5 ml promývacího pufru).

Po inkubaci bylo opakováno promývání (celkem 3x). Byl pipetován naředěný Streptavidin-PE (50 μ l/jamka). Zakrytá destička byla inkubována 30 min za mírného třepání a poté 3krát promyta. Nakonec byly mikropartikelky na destičce resuspendovány v 100 μ l promývacího pufru a po 2 min třepání byla měřena pomocí Luminex 200 IS 2.3 intenzita fluorescence - MFI (Median fluorescence intensity).

4.3.2 Izolace buněk z krve

Mononukleární buňky periferní krve (PBMC) byly izolovány z krve pacienta odebrané před transplantací do 10ml zkumavek s heparinem. Nesrážlivá krev byla přenesena do 50ml zkumavek a doplněna na objem 35 ml sterilním fosfátovým pufrem (PBS; pH 7,2 - 7,4). Do čistých zkumavek (50ml) bylo předem pipetováno 12,5 ml Ficoll-Pague roztoku, na který byla ředěná opatrně navrstvena. Zkumavky byly centrifugovány (20 min, 1000 g, při pokojové teplotě (RT)). Vzniklý prstenec byl poté Pasteurovou pipetou přenesen do čisté zkumavky a doplněn sterilním PBS do objemu 45 ml. Zkumavky byly opět centrifugovány 10 min (210 g, RT). Supernatant byl odebrán a buňky v peletě na dně roztrhány a naředěny 10 ml 20% média (IMDM ošetřené antibiotiky (penicilin, streptomycin) s fetálním hovězím sérem (FCS), 4 : 1). Izolované buňky byly zmrazeny (viz kapitola 4.3.3).

4.3.3 Zmražení buněk

Koncentrace izolovaných buněk byla spočítána pomocí analyzátoru částic a buněk Cedex XS a následně upravena na požadovanou koncentraci buněk $15 \cdot 10^6/\text{ml}$. Ředěné buňky byly pipetovány po 0,5 ml do řádně označených mrazicích ampulí, které byly uloženy v lednici (alespoň 20 min).

Mrazicí médium bylo připraveno smícháním 20% FCS v RPMI 1640 s DMSO v poměru 4 : 1) v ledové lázni a ponecháno 20 min na ledu. K vychlazené buněčné suspenzi pomalu přikapáváme 0,5 ml 20% roztoku DMSO (na výslednou koncentraci 10% DMSO). Uzavřené ampulky byly důkladně promíchány a kryokonzervovány postupným snižováním teploty pomocí přístroje Planer.

4.3.4 Rozmražení buněk

Ampule přenesené z dusíku se zmraženou buněčnou suspenzí byly opatrně vloženy do vodní lázně (37°C) než došlo k uvolnění „pecičky“ ode dna zkumavky. Ihned poté byly buňky přeneseny do 15ml zkumavek. Vzápětí byly k buňkám přikapávány cca 2 ml 20% média RPMI 1640 s FCS. Celkový objem byl na závěr doplněn na 10 ml.

Dále byly buňky inkubovány ve tmě 30 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly buňky stočeny na centrifuze 10 min (400 g), supernatant slit, buňky protřepány a přidáno 10 ml 20% RPMI 1640 s FCS. Celý proces promývání byl opakován dvakrát. Po konečné centrifugaci byla buněčná suspenze doplněna na objem 1 ml 20% médiem RPMI 1640 s FCS a spočítána na analyzátoru částic a buněk Cedex XS. S rozmraženými buňkami bylo dále pracováno (viz kapitoly 4.3.5 a 4.3.6).

4.3.5 Příprava směsi kontrolních buněk (POOL)

Směs kontrolních buněk, POOL, byla připravována z třiceti různých suspenzí buněk odebraných od zdravých dárců. V této směsi byly zastoupeny HLA antigeny dle testované populace.

Všech 30 buněčných suspenzí bylo rozmrazeno (viz kapitola 4.3.4) a vždy po pěti ampulích dáno celkem do šesti 50ml zkumavek. Zkumavky byly doplněny 20% médiem RPMI 1640 s FCS na celkový objem 45 ml a ponechány 30 min stát ve tmě, při laboratorní teplotě. Poté byly buňky 2x promyty (centrifugace 10 min, 400 g; odebrání supernatantu

a roztřepání pelety). K buněčné suspenzi bylo přidáno 10 ml 20% média a dle protokolu v kapitole 4.3.3 byly buňky zamrazeny.

4.3.6 Směsné lymfocytární kultury (MLC)

Buňky byly stimulovány k produkci protilátek ve směsných lymfocytárních kulturách. Pro naše účely byly použity jednosměrné MLC, kde u buněk dárce a u poloviny buněk příjemce byla zablokována replikace DNA pomocí Mitomycinu C a tím i aktivace a proliferace těchto buněk.

Blokace replikace buněk

K buněčné suspenzi o 0,5 ml bylo pipetováno 50 μ l Mitomycinu C (inkubace 30 min, 37 °C). Poté byla buněčná suspenze 2x promyta (centrifugace 10 min, 400g, RT) a naředěna na požadovanou koncentraci ($1 \cdot 10^6$ buněk/ml).

Vlastní MLC

Buňky byly nanесeny (podrobněji popsáno níže) na 96-jamkovou kultivační destičku Costar a inkubovány přibližně 72 h (5 % CO₂, 37 °C). Během třetího dne inkubace bylo k buňkám přidáno 50 μ l 10% kultivačního média RPMI 1640 s FCS.

Buňky příjemce (50 μ l ~ 50 000 PBMC) byly stimulovány se zablokovánými vlastními buňkami (autologní kontrola, 50 μ l ~ 50 000 PBMC), buňkami dárce (alogenní reakce, 50 μ l ~ 50 000 PBMC) a nakonec buněčnou suspenzí POOL (50 μ l ~ 50 000 PBMC). Buňky příjemce (50 μ l ~ 50 000 PBMC) s R848 (0,1 μ l, c = 1 μ l/ml) společně s rhIL-2 (1 μ l, c = 10 ng/ml) sloužily jako pozitivní kontrola správné stimulace buněk. Samotná buněčná suspenze POOL zablokována Mitomycinem C slouží jako kontrola funkčnosti Mitomycinu C. Všechny stimulace byly provedeny v kvadruplikátech (viz Tabulka 3).

Tabulka 3: Schematické znázornění nanесených vzorků na destičce.

A	B	C	D	E	F	G	H	
Příjemce & PříjemceX				Příjemce & DárceX				1
Příjemce & POOLX				Příjemce & rhIL-2 & R848				2
POOLX				Médium				3

4.3.7 IgG Enzyme-linked Immunosorbent spot assay (ELISpot)

Příprava ELISpot destičky

Nejprve byla naředěna protilátka anti-IgG (MT 91/145) sterilním PBS (pH 7,4) na koncentraci 15 µg/ml. Vzápětí byly membrány ELISpot destičky navlhčeny 70% etanolem (50 µl/jamka, max. 2 min) a poté 5krát omyty sterilní vodou (200 µl/jamka). Na destičku byla pipetována připravená MT 91/145 a inkubována přes noc (4 °C).

Druhý den byla ELISpot destička řádně zbavena protilátky a 5krát promyta sterilním PBS (200 µl/jamka), (k odstranění nenavázané protilátky). Dále byla 30 min inkubována (RT) s 10% médiem RPMI 1640 s FCS. Příprava destičky byla zahájena 3. den stimulace buněk v MLC.

Po odstranění média byly na destičku přeneseny stimulované buňky z MLC a k nim bylo přidáno (dalších) 50 µl 10% média RPMI 1640 s FCS. Destička byla inkubována přibližně 20 h (37 °C, 5% CO₂).

Další den byla destička vyklepnuta a 5krát promyta PBS (200 µl/jamka). Na destičku byla pipetována předem naředěná sekundární anti-IgG protilátka s navázaným biotinem (MT 78/145-biotin; ředění v 0,5% PBS s FCS na koncentraci 1 µg/ml) a inkubována 2 h ve tmě při RT. Pak byla destička 5krát promyta PBS (200 µl/jamka).

Během inkubace byl připraven Streptavidin s navázanou alkalickou fosfatázou (Streptavidin-ALP) v poměru 1 : 1000 0,5% PBS s FCS. Po promytí byl pak pipetován na destičku (100 µl/jamka) a inkubován 1 h (RT). Poté byla destička 5krát promyta PBS (200 µl/jamka). Na závěr byl na destičku pipetován přefiltrovaný (velikost pórů 0,45 µm) vyvíječ BCIP/NBT (100 µl/jamka). Po vyvinutí spotů (cca 5 – 10 min) byla destička důkladně opláchnuta pod tekoucí vodou a sušena bez přístupu světla. Suchá ELISpot destička byla analyzována na přístroji BIOREADER®-6000-Eα.

Vyhodnocení dat

Z naměřených dat byl vypočítán průměr, medián a stimulační index (SI), pro každý transplantovaný pár (příjemce-dárce).

Výpočet stimulačního indexu (SI):

$$SI = \frac{(PL + DL_x)}{(PL + PL_x)}$$

4.3.8 Stanovení anti-HLA protilátek metodou LabScreen

Nejprve byl 10krát zředěn promývací roztok. buněčný supernatant odebraný po 3. dnu MLC byl stočen (10 min, 8000 g). Na 96-jamkovou destičku bylo pipetováno 20 μ l stočeného buněčného supernatantu a do jedné jamky jako negativní kontrola 20 μ l PBS, který sloužil jako negativní kontrola. Do každé jamky byly přidány mikrokuličky (5 μ l/jamka), které byly předem centrifugovány (3 s, 1300 g) a vortexovány. Destička byla překryta neprůhlednou fólií, jemně vortexována a inkubována 30 min na třepače.

Poté byl přidán promývací roztok (150 μ l/jamka), a destička byla krátce vortexována a dále centrifugována (5 min, 1300 g). Supernatant byl odstraněn z destičky a promývací krok byl 2krát opakován (200 μ l/jamka). Dále byl přidán roztok fykoerytrinu (PE), který byl předtím 10x naředěn promývacím roztokem. Destička byla překryta neprůhlednou fólií, jemně vortexována a inkubována 30 min na třepače.

Opět byla destička 2krát promyta (promývacím roztokem), (200 μ l/jamka). Následně bylo do každé jamky pipetováno PBS (80 μ l/jamka). Destička byla jemně vortexována.

Měření bylo provedeno na přístroji Luminex 200 IS 2.3. Počet analyzovaných kuliček musí být minimálně 50 (max 100). Je měřena intenzita fluorescence sekundární protilátky, kterou vyjadřujeme jako MFI (mean fluorescence intensity). Výsledky byly analyzovány pomocí programu HLA Fusion. Pro vyhodnocení byla určena hranice negativní kontroly na 500 MFI.

4.4 Statistické zpracování dat

Při statistickém vyhodnocení byly výsledky obou experimentů zpracovány v programu Graphpad InStat 5 a MedCalc Software.

U obou experimentů byla data analyzována pomocí Mann-Whitneyova testu (věk, koncentrace sérového kreatininu, BAFF cytokin, počet buněk produkujících IgG a počet neshod v HLA antigenech), χ^2 -testu a (pohlaví, přítomnost PRA a DSA, kompatibilita příjemce a dárce v AB0 systému, počet transplantací, indukční a udržovací imunosuprese, FCXM-B). V případě nedostatku hodnot byla použita χ^2 -test s Yatesovou korekcí.

Výsledky jsou uvedené jako průměr \pm směrodatná odchylka nebo procento. Rozdíly mezi daty jsou statisticky významné, pokud p hodnota $< 0,05$.

5 Výsledky

5.1 Experiment 1 - BAFF cytokin

5.1.1 Demografické údaje ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce

Soubor pacientů byl složen z 19 rizikových pacientů s diagnostikovanou akutní humorální rejekcí (11 mužů a 8 žen) a 17 kontrolních pacientů bez rejekce (10 mužů a 7 žen; kontrolní skupina). Průměrný věk rizikové skupiny byl 55 ± 6 let a kontrolní 51 ± 17 let.

Z celkového počtu 36 pacientů proběhla v šesti případech transplantace od živého dárce. U pěti z nich se vyskytla akutní humorální rejekce, přičemž u čtyř z těchto pacientů byla zároveň diagnostikována akutní celulární rejekce. 30 pacientů dostalo ledvinu od kadaverózního dárce.) Žádný z pacientů neprodělal opakovanou transplantaci. U 11 rizikových pacientů došlo i přes podání indukční imunosuprese (např. ATG⁷, Simulect⁸) k vývoji AMR. Ve třech případech došlo současně k rejekci celulární. Jako udržovací imunosuprese byla nejvíce používána trojkombinace FK506⁹, Rapamycinu¹⁰ s Prednisonem¹¹.

Demografické údaje a další klinická data uvedená výše jsou shrnuta v následující tabulce (viz Tabulka 4). Nezjistili jsme žádný signifikantní rozdíl mezi pacienty bez rejekce a s rejekcí ve vztahu k pohlaví a věku příjemce. Významný rozdíl v závislosti na typu dárce (živý, kadaverózní) nebyl rovněž prokázán.

⁷ ATG – imunosupresivum, antithymocytární globulin

⁸ Simulect (Basiliximab) – protilátka proti IL-2 α (CD25) receptoru T lymfocytů

⁹ FK506 (Takrolimus, Advagraf, Prograf) – imunosupresivum, které inhibuje aktivaci T lymfocytů

¹⁰ Rapamycin (Sirolimus) – imunosupresivum, které inhibuje aktivaci a proliferaci T a B lymfocytů

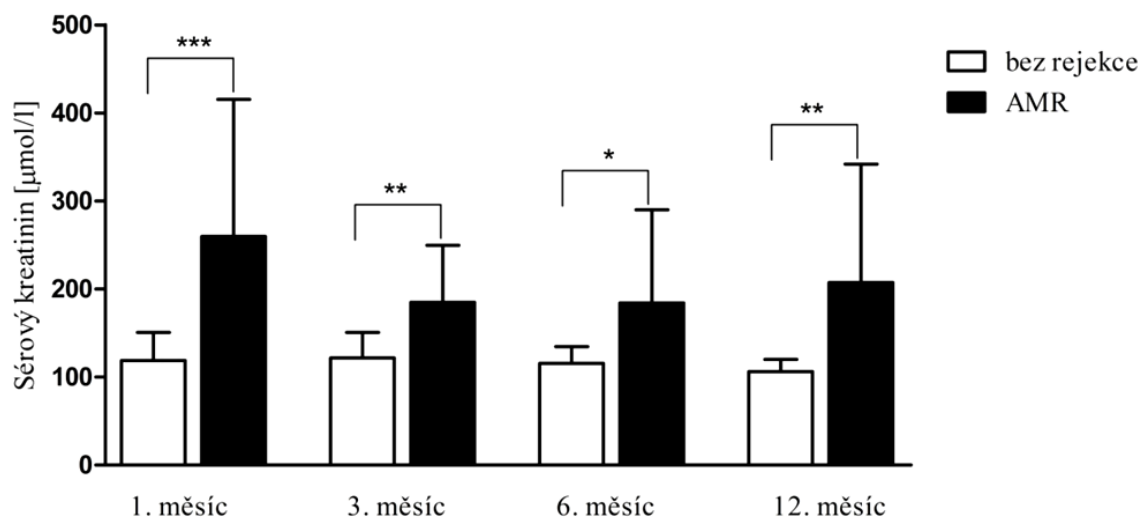
¹¹ Prednison – imunosupresivní lék ze skupiny kortikosteroidů, které mají protizánětlivé účinky

Tabulka 4: Demografické údaje a klinická data příjemců ledviny a výskyt akutní humorální rejekce.

Vysvětlivky: AMR – akutní humorální rejekce, FK506 – takrolimus, inhibitor T lymfocytů, MMF – mykofenolát mofetil, NS – nesignifikantní. Použité statistické analýzy: ^a – χ^2 test, ^b – Mann-Whitneyův test.

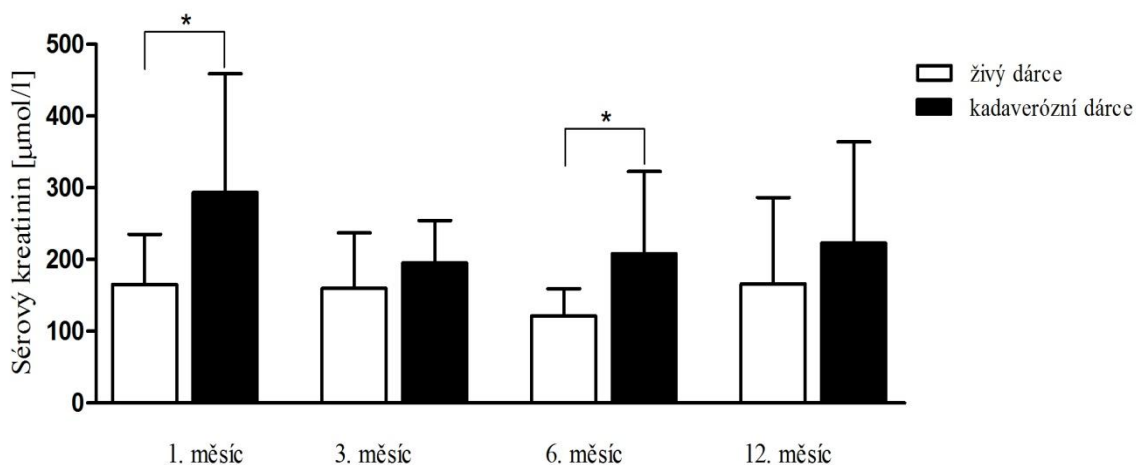
		Bez rejekce		AMR		P hodnota
		n = 17	Rozsah/[%]	n = 19	Rozsah/[%]	
Věk příjemce ^b	n = 36	55 ± 6	(44 - 66)	51 ± 16	(34 - 82)	NS
Pohlaví příjemce ^a	Muž (n = 21)	10	48 %	11	52 %	NS
	Žena (n = 15)	7	47 %	8	53 %	
Typ dárce ^a	Živý (n = 6)	1	17 %	5	83 %	NS
	Kadaverózní (n = 30)	16	53 %	14	47 %	
Sérový kreatinin[μmol/l] ^b	1. měsíc (n = 36)	117 ± 32	(81 - 208)	260 ± 156	(109 - 426)	< 0,0001
	3. měsíc (n = 34)	124 ± 30	(82 - 204)	185 ± 65	(99 - 312)	< 0,01
	6. měsíc (n = 33)	113 ± 20	(79 - 159)	184 ± 106	(78 - 518)	< 0,05
	12. měsíc (n = 35)	104 ± 14	(73 - 134)	207 ± 135	(93 - 614)	< 0,001
Indukční imunosuprese ^a	Ne (n = 24)	16	67 %	8	33 %	< 0,01
	Ano (n = 12)	1	8 %	11	92 %	
Udržovací imunosuprese ^a	FK506, MFF, Prednison (n = 30)	14	82 %	16	84 %	NS
	FK506, Rapamycin, Prednison (n = 2)	0	0 %	2	11 %	
	Cyklosporin, MFF, Prednison (n = 2)	2	12 %	0	0 %	
	Jiná (n = 2)	1	6 %	1	5 %	

Pacienti s humorální rejekcí měli signifikantně vyšší koncentraci sérového kreatininu ve všech sledovaných obdobích – 1. měsíc ($p < 0,0001$), 3. měsíc ($p < 0,01$), 6. měsíc ($p < 0,05$) i 12. měsíc ($p < 0,001$) po transplantaci ledviny (viz Obr. 10).



Obr. 10: Koncentrace sérového kreatininu v závislosti na výskytu akutní humorální rejekce. Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Dále jsme porovnávali koncentraci sérového kreatininu v závislosti na typu dárce u pacientů s AMR. Statistická analýza prokázala v případě živého dárce ($n = 5$) signifikantně nižší koncentraci kreatininu než v případě dárce kadaverózního ($n = 14$) v 1. a 6. měsíci ($p < 0,05$) po transplantaci (viz Obr. 11).

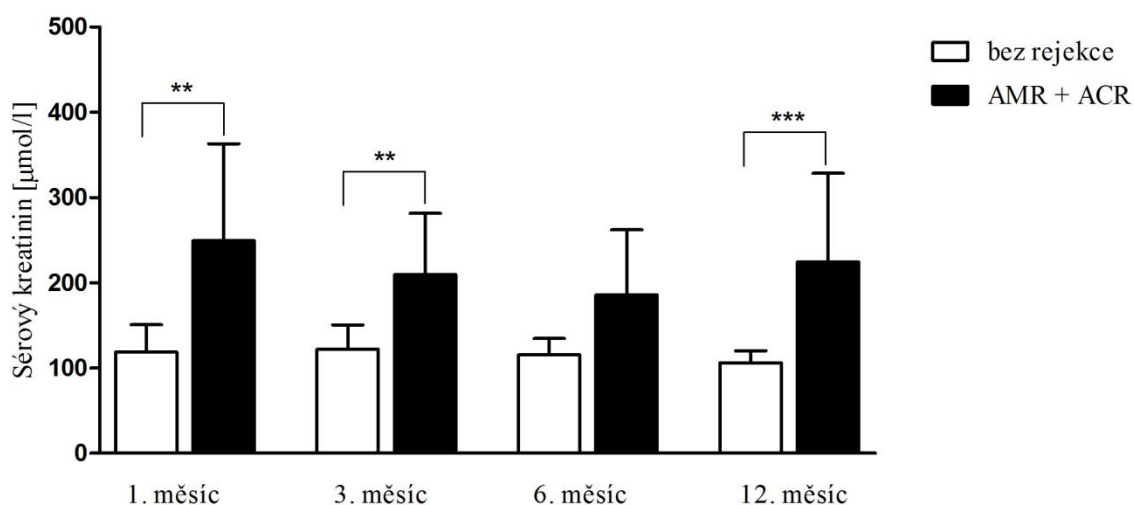


Obr. 11: Koncentrace sérového kreatininu v závislosti na typu dárce u pacientů s akutní humorální rejekcí. Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem (* $p < 0,05$).

5.1.2 Demografická data ve vztahu s kombinovanou rejekcí

Mezi pacienty s akutní humorální rejekcí ($n = 19$) se vyskytlo 9 pacientů (5 mužů a 4 ženy), kteří zároveň vyvinuli i akutní celulární rejekci (ACR). Průměrný věk těchto pacientů s kombinovanou rejekcí (AMR + ACR) byl 53 ± 14 let. Nenalezli jsme žádný statisticky významný rozdíl u pacientů s kombinovanou rejekcí a bez rejekce ve vztahu k pohlaví, věku, použití indukční a udržovací imunosuprese. 4 příjemci s kombinovanou rejekcí přijali ledvinu od žijícího dárce a 5 příjemců přijalo ledvinu od kadaverózního dárce (viz Tabulka 5).

Koncentrace sérového kreatininu u pacientů bez rejekce v 1. měsíci ($p < 0,01$), 3. měsíci ($p < 0,01$) a 12. měsíci ($p < 0,001$) po transplantaci ledviny byla signifikantně nižší než u pacientů s ACR (viz Obr. 12).



Obr. 12: Koncentrace sérového kreatininu v závislosti na výskytu kombinované rejekce (AMR + ACR) Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tabulka 5: Demografické údaje a klinická data příjemců ledviny a výskyt kombinované rejekce.

Vysvětlivky: ACR – akutní celulární rejekce, FK506 – takrolimus, MMF – mykofenolát mofetil, NS – nesignifikantní.

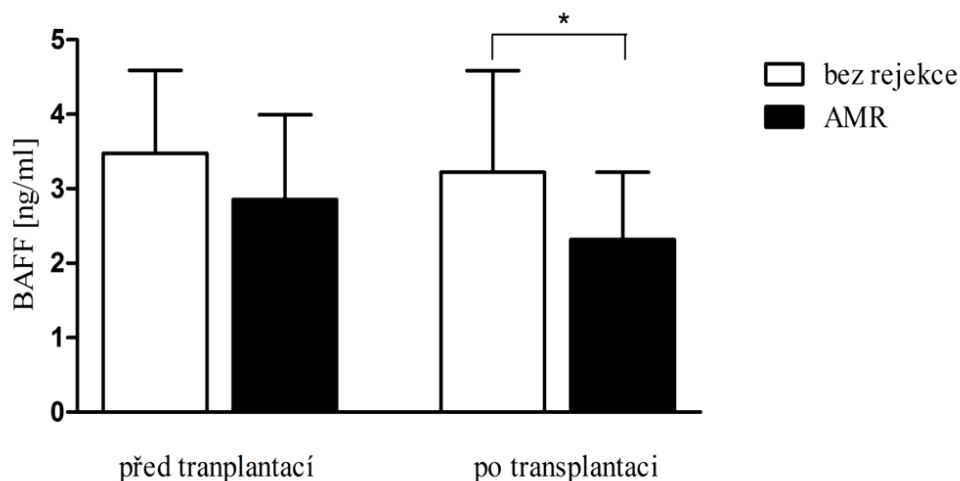
Použité statistické analýzy: ^a – χ^2 test, ^b – Mann-Whitneyův test.

		Bez rejekce		AMR + ACR		P hodnota
		n = 17	Rozsah/[%]	n = 9	Rozsah/[%]	
Věk příjemce ^b	n = 26	55 ± 6	(44 - 66)	53 ± 14	(34 - 72)	NS
Pohlaví příjemce ^a	Muž (n = 15)	10	69 %	5	31%	NS
	Žena (n = 11)	7	56 %	4	44%	
Typ dárce ^a	Živý (n = 5)	1	20 %	4	80%	NS
	Kadaverózní (n = 21)	16	79 %	5	21%	
Sérový kreatinin [μmol/l] ^b	1. měsíc (n = 26)	117 ± 32	(81 - 208)	249 ± 114	(121 - 426)	< 0,01
	3. měsíc (n = 24)	124 ± 30	(82 - 204)	209 ± 72	(118 - 313)	< 0,01
	6. měsíc (n = 23)	113 ± 20	(79 - 159)	186 ± 76	(101 - 300)	NS
	12. měsíc (n = 25)	104 ± 14	(73 - 133)	225 ± 104	(107 - 381)	< 0,001
Indukční imunosuprese ^a	Ne (n = 22)	16	80 %	6	20 %	NS
	Ano (n = 4)	1	40 %	3	60 %	
Udržovací imunosuprese ^a	FK506, MFF, Prednison (n = 21)	14	82 %	7	78 %	NS
	FK506, Rapamycin, Prednison (n = 2)	0	0 %	2	22 %	
	Cyklosporin, MFF, Prednison (n = 2)	2	12 %	0	0 %	
	Jiná (n = 1)	1	6 %	0	0 %	

5.1.3 Vybrané faktory ve vztahu k výskytu akutní humorální

Počet HLA neshod (max počet neshod 6) u pacientů bez rejekce ($n = 17$, $4,3 \pm 1,6$) se signifikantně neliší od pacientů s humorální rejekcí ($3,9 \pm 1,6$). Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Dále jsme sledovali hladinu PRA před transplantací. Dvanáct pacientů bez rejekce mělo hladinu PRA $< 10 \%$ a šest vykazovalo hladinu PRA $\geq 10 \%$. Mezi příjemci s rejekcí bylo 46 % pacientů ($n = 7$), kteří měli $< 10 \%$ PRA, a 52 % ($n = 8$) mělo $\geq 10 \%$ PRA. Nebyl zde rovněž prokázán signifikantní rozdíl mezi výskytem PRA před transplantací a výskytem AMR (viz Tabulka 6).

Rozdíl v sérové koncentraci BAFF cytokinu před transplantací mezi pacienty bez rejekce ($3,5 \pm 0,9$ ng/ml) a pacienty s humorální rejekcí ($2,9 \pm 0,7$ ng/ml) nebyl prokázán jako statisticky významný. Poté byla měřena koncentrace BAFF cytokinu v sérech odebraných po transplantaci. Potransplantační koncentrace BAFF cytokinu u pacientů bez rejekce byly $3,2 \pm 1,0$ ng/ml a u pacientů s humorální rejekcí $2,3 \pm 0,7$ ng/ml. Pacienti s AMR vykazovali po transplantaci signifikantně nižší koncentraci BAFF než pacienti bez rejekce ($p < 0,05$) (viz Obr. 13).



Obr. 13: Koncentrace BAFF před a po transplantaci u pacientů bez rejekce a s akutní humorální rejekcí. Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem (* $p < 0,05$).

Tabulka 6: Vybrané faktory ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce.

Vysvětlivky: AMR – akutní humorální rejekce, BAFF – aktivační faktor B buněk, HLA – Human leukocyte antigen, PRA – panel-reaktivní protilátky, Tx – transplantace.

Použité statistické analýzy: ^a – χ^2 test, ^b – Mann-Whitneyův test.

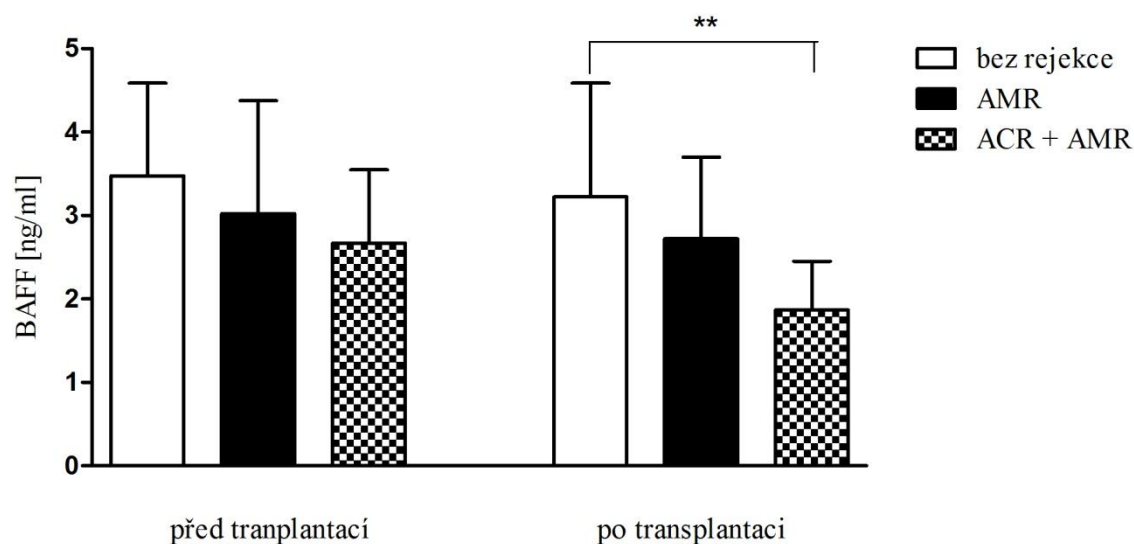
¹ – období, ve kterém byla stanovena koncentrace sérového kreatininu, se shoduje s obdobím odebrání séra určeného k určení koncentrace BAFF.

		Bez rejekce		AMR		P hodnota
		n = 17	Rozsah/ [%]	n = 19	Rozsah/ [%]	
PRA ^a	< 10 % (n = 23)	11	48 %	12	52 %	NS
	≥ 10 % (n = 13)	6	46 %	7	54 %	
PRA ^a	< 50 % (n = 32)	15	47 %	17	53 %	NS
	≥ 50 % (n = 4)	2	50 %	2	50 %	
Počet HLA neshod ^b	(n = 29)	4,3 ± 1,6	(0 - 6)	3,9 ± 1,6	(0 - 6)	NS
Sérový kreatinin [μmol/l] ^{1 a}	(n = 36)	122 ± 22	(82 - 204)	***436 ± 168	(153 - 980)	< 0,0001
BAFF [ng/ml] ^b	před Tx (n = 36)	3,5 ± 0,9	(1,8 - 5,6)	2,9 ± 0,7	(1,9 - 6,7)	NS
	po Tx (n = 36)	3,2 ± 1,0	(1,6 - 6,6)	*2,3 ± 0,7	(1,4 - 4,2)	< 0,05

5.1.4 Vybrané faktory ve vztahu k výskytu kombinované rejekce

Šest pacientů s AMR a jeden pacient s ACR měli hladinu PRA vyšší než 10 % a statistická analýza neprokázala signifikantní rozdíl mezi hladinou PRA a výskytem rejekce. U všech tří skupin pacientů (bez rejekce, s AMR, s kombinovanou rejekcí) jsme shledali takřka stejný průměrný počet neshod v HLA antigenech. Ani zde nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Koncentraci sérového kreatininu jsme shledali signifikantně vyšší u pacientů s humorální rejekcí i u pacientů s celulární rejekcí v porovnání s pacienty bez rejekce ($p < 0,0001$), (viz Tabulka 7).

Stanovení koncentrace BAFF cytokinu v séru před transplantací neprokázalo signifikantní rozdíl mezi pozorovanými skupinami - bez rejekce, s humorální rejekcí a s humorální i celulární rejekcí. Leč byl pozorován pouze klesající trend mezi skupinami. Koncentrace BAFF po transplantaci byla u pacientů ($n = 9$), kteří měli zároveň rejekci humorální i celulární, signifikantně nižší než u pacientů bez rejekce ($p < 0,05$). U 10 pacientů pouze s AMR jsme neprokázali signifikantně nižší koncentrace BAFF. Obdobně jako v měřeních před transplantací byl pozorován trend nižších koncentrací BAFF oproti pacientům bez rejekce ($p = 0,0653$), (viz Obr. 14).



Obr. 14: Koncentrace BAFF cytokinu před a po transplantaci (u pacientů s kombinovanou rejekcí). Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem (** $p < 0,01$).

Tabulka 7: Vybrané rizikové faktory ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce a akutní celulární rejekce.

Vysvětlivky: ACR – akutní celulární rejekce, AMR – akutní humorální rejekce, BAFF – aktivační faktor B buněk, HLA – Human leukocyte antigen, PRA – panel-reaktivní protilátky, Tx – transplantace.

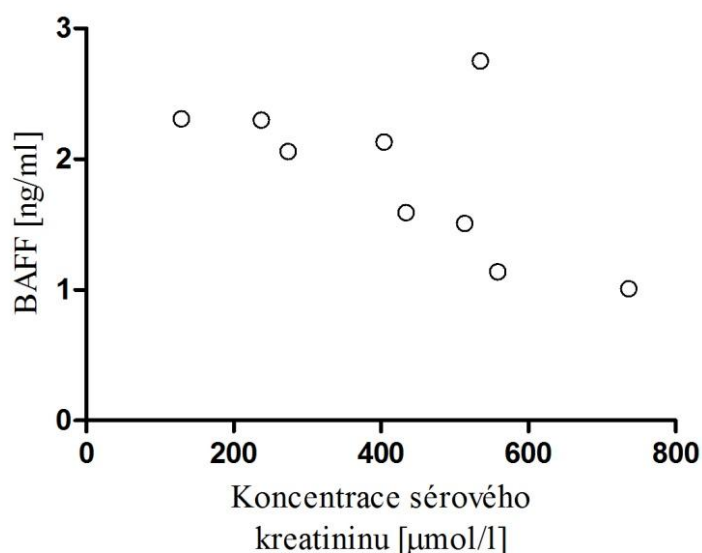
Použité statistické analýzy: ^a – χ^2 test, ^b – Mann-Whitneyův test.

¹ – období, ve kterém byla stanovována koncentrace sérového kreatininu, se shoduje s obdobím odebrání séra určeného k měření koncentrace BAFF

*** – vztaženo ke skupině bez rejekce, ** – vztaženo ke skupině bez rejekce.

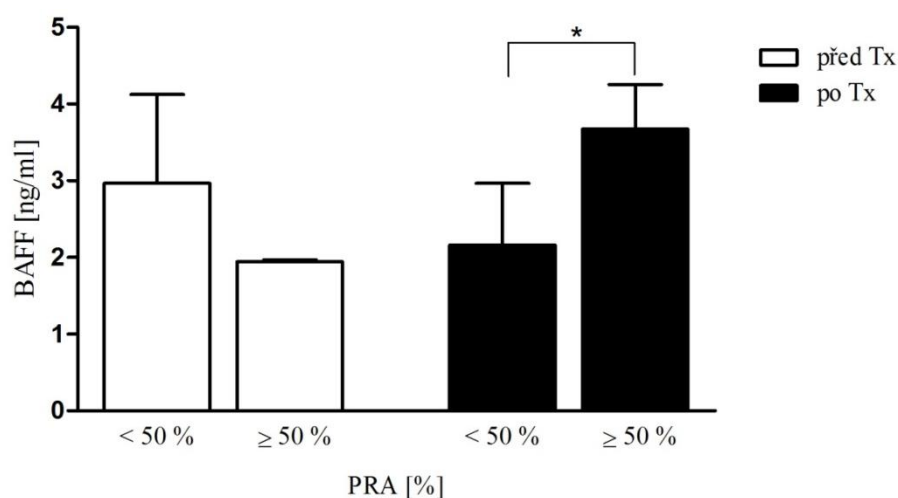
		Bez rejekce		AMR		AMR + ACR		P hodnota
		n = 17	Rozsah[%]	n = 10	Rozsah[%]	n = 9	Rozsah[%]	
PRA ^a	< 10 % (n = 23)	11	48 %	4	17 %	8	35 %	NS
	≥ 10 % (n = 13)	6	46 %	6	46 %	1	8 %	
PRA ^a	< 50 % (n = 32)	15	47 %	8	25 %	9	28 %	NS
	≥ 50 % (n = 4)	2	50 %	2	50 %	0	0 %	
Neshody v HLA ^b	n = 29	4,3 ± 1,6	(0 - 6)	3,9 ± 1,6	(0 - 6)	4,3 ± 1,5	(0 - 6)	NS
Sérový kreatinin [μmol/l] ^{1 a}	n = 36	122 ± 22	(82 - 204)	***448 ± 178	(153 - 980)	***442 ± 183	(129 - 736)	< 0,0001
BAFF [ng/ml] ^b	před Tx (n = 36)	3,5 ± 0,9	(1,8 - 5,6)	3,0 ± 0,8	(1,9 - 6,7)	2,7 ± 0,7	(1,7 - 4,1)	NS
	po Tx (n = 36)	3,3 ± 1,1	(1,6 - 6,6)	2,7 ± 0,8	(1,4 - 4,2)	**1,9 ± 0,5	(1,0 - 2,8)	< 0,01

Dále byla porovnávána koncentrace sérového kreatininu mezi pacienty bez rejekce a pacienty s AMR v sérech vybraných pro stanovení BAFF cytokinu po transplantaci. Pacienti s AMR měli statisticky významně vyšší koncentraci sérového kreatininu po transplantaci než pacienti bez rejekce ($p < 0,0001$). Korelovali jsme koncentraci sérového kreatininu s koncentrací BAFF cytokinu po transplantaci u pacientů s AMR i bez ní a také u pacientů se současným průběhem AMR a ACR, kde je vidět mírná negativní korelace mezi sledovanými veličinami (viz Obr. 15). Nicméně mezi sledovanými veličinami nebyla prokázána žádná signifikantní vazba.



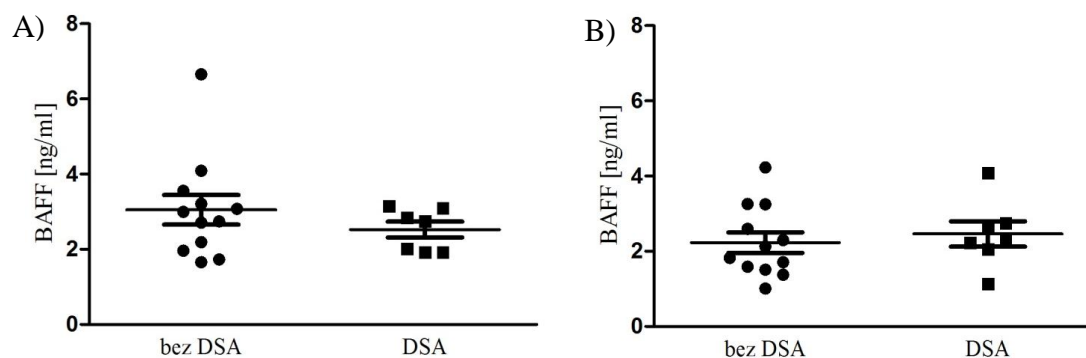
Obr. 15: Korelace koncentrace sérového kreatininu s koncentrací sérového BAFF u pacientů s AMR a současnou ACR.

Přítomnost vysoké hladiny PRA nad 50 % jsme porovnávali s koncentracemi BAFF cytokinu měřenými před transplantací a po transplantaci. Byli zaznamenáni 2 pacienti (z celkového počtu 19) s AMR, kteří měli vyšší PRA než 50 % (viz Obr. 16). U pacientů s akutní humorální rejekcí jsme shledali signifikantně vyšší koncentraci BAFF cytokinu po transplantaci než u pacientů bez rejekce. U pacientů bez rejekce nebyl prokázán signifikantní rozdíl.



Obr. 16: Srovnání přítomnosti PRA s koncentrací BAFF cytokinu před a po transplantaci u pacientů s akutní humorální rejekcí. Hodnoceno Man-Whitneyovým testem (* $p < 0,05$).

Provedli jsme srovnání naměřených dat BAFF cytokinu v séru u pacientů s humorální rejekcí v závislosti na přítomnosti donor-specifických protilátek. Celkem 7 pacientů s AMR mělo před transplantací přítomné DSA, zatímco u 12 z nich nebyla jejich přítomnost zjištěna. Neprokázali jsme žádný vztah mezi přítomností DSA a hladinou BAFF v séru (viz Obr. 17).



Obr. 17: Koncentrace BAFF cytokinu před (A) a po transplantaci (B) v závislosti na přítomnosti donor-specifických protilátek.

5.2 Experiment 2 - IgG ELISpot

5.2.1 Demografická data

Soubor, u kterého jsme detekovali počet B lymfocytů produkujících IgG po stimulaci dárčovými buňkami, zahrnoval 37 pacientů (28 mužů a 9 žen). Tito pacienti (průměrný věk 41 ± 10 let) podstoupili transplantaci ledviny od žijícího dárce s . Dohromady bylo celkem 6 pacientů s AMR. Pět pacientů z celkového počtu podstoupilo opakovanou transplantaci ledviny, dva z nich byli bez rejekce a tři vyvinuli AMR (50 % pacientů s AMR). Šesti pacientům byla podána indukční imunosuprese (ATG), z čehož třem byla diagnostikována AMR (viz Tabulka 8). Nejvíce používanou udržovací imunosupresí byla trojkombinace FK506, MFF, Prednison, která byla nasazena 33 pacientům (28 pacientů bez rejekce, 5 pacientů s AMR).

Nebyl nalezen statisticky významný vliv pohlaví a věku příjemce i dárce na rozvoj akutní humorální rejekce. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v koncentraci sérového kreatininu u skupin pacientů bez rejekce a s akutní humorální rejekcí (viz Tabulka 8).

Tabulka 8: Demografické údaje a klinická data ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce.

Vysvětlivky: AMR – akutní humorální rejekce, FK506 – takrolimus, MMF – mykofenolát mofetil, NS – nesignifikantní, Tx – transplantace.

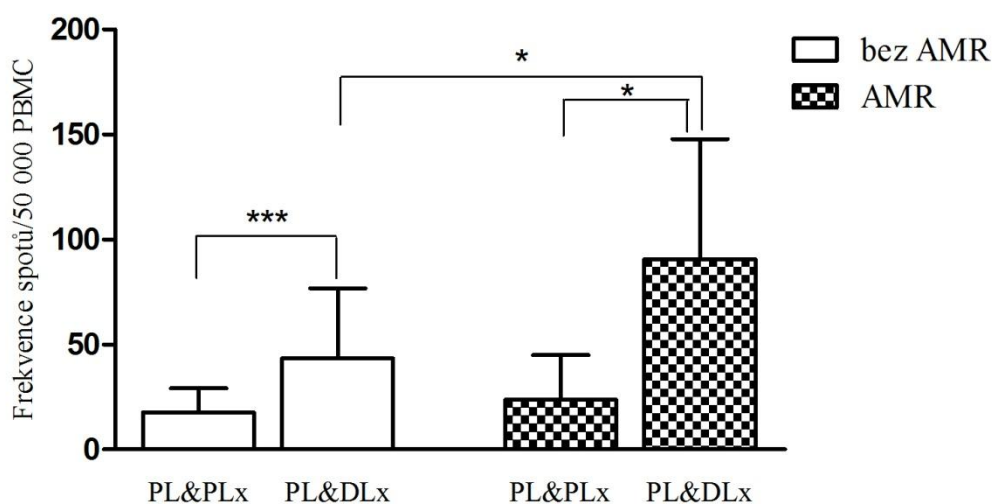
Použité statistické analýzy: ^a – χ^2 test, ^b – Mann-Whitneyův test.

		Bez rejekce		AMR		P hodnota
		n = 19	Rozsah/[%]	n = 6	Rozsah/[%]	
Věk ^b	Příjemce	42 ± 11	(19 - 69)	41 ± 10	(19 - 59)	NS
	Dárce	53 ± 10	(31 - 67)	47 ± 8	(32 - 60)	NS
Pohlaví ^a	Muž (n = 17)	14	82 %	3	18 %	NS
	Žena (n = 8)	5	63 %	3	37 %	
Počet Tx ^a	= 1 (n = 21)	17	81 %	4	19 %	NS
	> 1 (n = 4)	2	50 %	2	50 %	
AB0 kompatibilita ^a	Ano (n = 21)	16	76 %	5	24 %	NS
	Ne (n = 4)	3	75 %	1	25 %	
Sérový kreatinin [μmol/l] ^b	3. měsíc (n = 25)	144 ± 23	(82 - 187)	129 ± 11	(106 - 143)	NS
	6. měsíc (n = 25)	149 ± 40	(77 - 340)	113 ± 21	(66 - 147)	NS
	12. měsíc (n = 23)	150 ± 41	(84 - 408)	131 ± 15	(107 - 151)	NS
Indukční imunosuprese ^a	Ano (n = 6)	3	50 %	3	50 %	NS
	Ne (n = 19)	16	84 %	3	16 %	
Udržovací imunosuprese ^a	FK506, Prednison (n = 1)	1	5 %	0	0 %	NS
	FK506, MMF, Prednison (n = 23)	18	95 %	5	83 %	
	Cyklosporin A, Prednison, MFF (n = 1)	0	0 %	1	17 %	

5.2.2 Rizikové faktory ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce

Výskyt AMR jsme porovnávali s počtem neshod v I. a II. třídě HLA antigenů a s hladinou PRA, u obou sledovaných faktorů jsme neprokázali statisticky významné výsledky. Zjistili jsme, že pacienti, kteří měli pozitivní křížovou zkoušku průtokovou cytometrií pro B lymfocyty (FCXM-B), měli vyšší riziko vývoje AMR ($p < 0,01$).

Při analýze výsledků IgG ELISpot jsme porovnali počet spotů v reakci příjemce proti dárce (PL & DLx). jsme zjistili signifikantní rozdíl mezi skupinou pacientů s AMR a bez AMR ($p < 0,05$), (viz Obr. 18). Dále jsme určili rozdíl v počtu spotů u reakce příjemce proti sobě (PL & PLx), kde nebyl objeven statisticky významný rozdíl mezi sledovanými skupinami. Shledali jsme statisticky významný rozdíl v počtu spotů u pacientů bez rejekce, kdy byly srovnávány reakce autologní (PL & PLx) proti alogenní (PL & DLx), ($p < 0,001$). Stejný signifikantní výsledek byl shledán i u skupiny pacientů s AMR. Tabulka 9 shrnuje všechny porovnávané rizikové faktory u AMR.



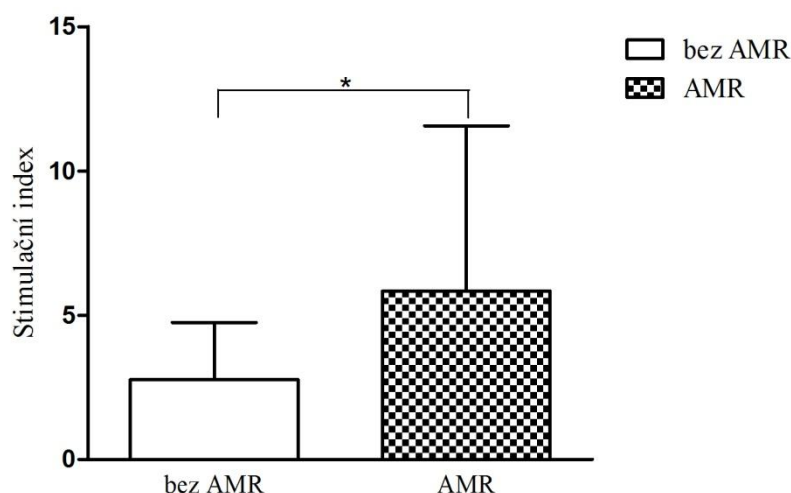
Obr. 18: Frekvence spotů a výskyt akutní humorální rejekce. Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$). Vysvětlivky: PL – příjemce ledviny, DL – dárce ledviny.

Tabulka 9: Rizikové faktory ve vztahu s výskytem akutní humorální rejekce.

Vysvětlivky: AMR – akutní humorální rejekce, HLA – lidský leukocytární antigen, PRA – panel-reaktivní protilátky, PL – příjemce ledviny, DL – dárce ledviny, SI – stimulační index, Tx – transplantace.

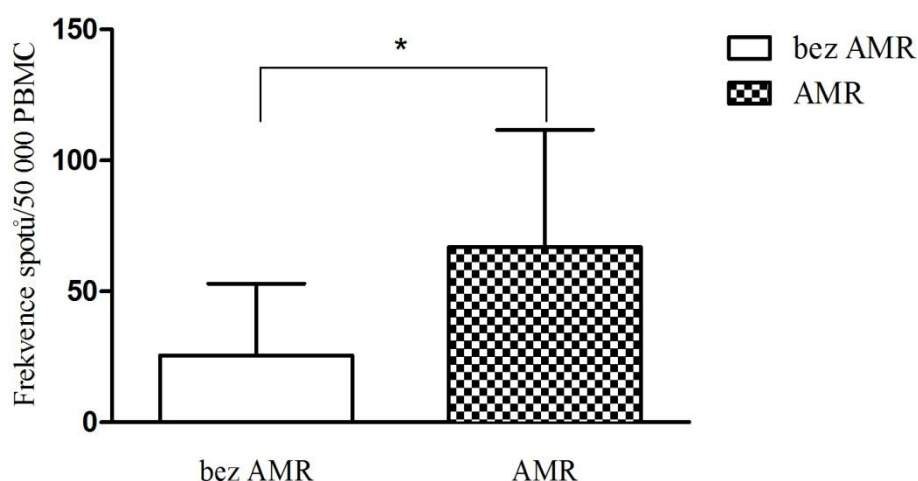
Použité statistické analýzy: ^a – χ^2 test, ^b – Mann-Whitneyův test.

		Bez AMR		AMR		P hodnota
		n = 31	Rozsah/[%]	n = 6	Rozsah/[%]	
Neshody v HLA ^a	A, B	2,2 ± 1,2	(0 - 4)	3,0 ± 0,7	(0 - 4)	NS
	DR	1,1 ± 0,5	(0 - 2)	1,3 ± 0,7	(0 - 2)	NS
	Celkem	3,3 ± 1,6	(0 - 6)	4,3 ± 1,3	(0 - 6)	NS
PRA ^a	< 10 % (n = 35)	29	49 %	6	17 %	NS
	≥ 10 % (n = 2)	2	100 %	0	0 %	
FCXM-B ^a	Negativní (n = 30)	28	57 %	2	7 %	< 0,01
	Pozitivní (n = 4)	1	25 %	3	**75 %	
ELISpot ^b	PL&DL _x	43,3 ± 33,4	(3,5 - 139)	*90,6 ± 57,2	(15,5 - 179,5)	< 0,05
	PL&PL _x	17,7 ± 11,4	(2 - 45)	23,7 ± 21,3	(7,5 - 50,5)	NS
	SI	2,7 ± 1,9	(1 - 9,7)	*5,8 ± 5,7	(2,0 - 17,2)	< 0,05



Obr. 19: Srovnání stimulačního indexu mezi pacienty bez akutní humorální rejekce a s akutní humorální rejekcí.
Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem (* $p < 0,05$).

Srovnáním stimulačního indexu (SI) u obou skupin (bez AMR, s AMR) jsme zjistili signifikantní rozdíl mezi pozorovanými skupinami ($p < 0,05$), (viz Obr. 19). Dále jsme pozorovali, že pacienti s AMR mají signifikantně vyšší frekvenci stimulovaných buněk, kdy jsme odečetli počet spotů v autologní reakci od reakce alogenní, než pacienti bez rejekce, což souvisí s výše uvedenými zjištěními (viz Obr. 20).



Obr. 20: Frekvence spotů po odečtení autologní reakce od alogenní reakce ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce.
Hodnoceno Mann-Whitneyovým testem (* $p < 0,05$).

6 Diskuze

Cílem této práce bylo zavést metodiku IgG ELISpot na oddělení imunogenetiky IKEM a zhodnotit její klinický význam pro predikci vývoje humorální rejekce. Dále jsme si kladli za cíl porovnat koncentraci sérového BAFF u rizikových pacientů a kontrolní skupiny před a po transplantaci a přispět tak k vyhodnocení rizika vzniku humorální rejekce po transplantaci ledviny.

Humorální rejekce je závažnou příčinou akutní dysfunkce transplantované ledviny a bez adekvátní léčby v naprosté většině případů vede ke ztrátě štěpu. Jak bylo popsáno v literárním úvodu, hlavní roli v humorální rejekci hrají B lymfocyty. Role B lymfocytů v transplantačních reakcích je komplexní. B buňky produkují jak protilátky, tak prezentují peptidy buňkám imunitního systému.

Klíčovým regulátorem přirozené homeostázy B buněk je BAFF cytokin, který patří do TNF superrodiny. Poskytuje signály k přežití a maturaci naivním a paměťovým B lymfocytům, kontroluje protilátkovou odpověď a podporuje přežití plazmablastů a plazmatických buněk. Bylo pozorováno, že povrchová exprese BAFF na buňkách periferní krve byla zvýšena u pacientů s abnormální funkcí štěpu a s vysokými hladinami panel-reaktivních protilátek (Xu et al., 2009b). Navíc, pacienti po transplantaci ledviny s vysokými koncentracemi BAFF cytokinu měli vyšší pravděpodobnost vývoje donor-specifických protilátek (Thibault-Espitia et al., 2012). Vysoká koncentrace BAFF byla také zjištěna u pacientů před i po imunoterapii Alemtuzumabem (monoklonální protilátka proti CD52) nebo Rituximabem (anti-CD20), (Zarkhin et al., 2009, Bloom et al., 2009, Banham et al., 2013).

V předkládané práci jsme porovnali koncentrace BAFF cytokinu u pacientů s humorální rejekcí a bez rejekce, jak před transplantací, tak po transplantaci. Náš soubor se skládal z rizikové skupiny 19 pacientů s humorální rejekcí, kdy 9 z nich mělo současně rejekci celulární. Kontrolní skupinu tvořilo 17 pacientů bez rejekce. Analýza demografických dat obou souborů neprokázala statisticky významný vliv pohlaví a věku příjemce a typu udržovací imunosuprese na vznik humorální rejekce.

U 11 pacientů z celkových 12, kterým byla podána indukční imunosuprese, mělo humorální rejekci. Tyto výsledky pouze naznačují, že pacienti, kterým byla podána

indukční imunoterapie, již před transplantací patřili do vysoce rizikové skupiny a i přes intenzivní imunosupresivní léčbu se u nich rejekce vyskytla.

Pacienti s humorální rejekcí měli po transplantaci signifikantně vyšší koncentraci sérového kreatininu než pacienti bez rejekce, což nasvědčuje tomu, že AMR trvale poškodila trvale funkci transplantovaných orgánů. Naše pozorování potvrzuje literární údaje o tom, že AMR je mnohem závažnější komplikací než je rejekce celulární (Colvin & Smith, 2005).

Zjistili jsme, že pacienti s ledvinou od žijícího dárce, kteří zároveň vyvinuli rejekci po transplantaci, měli signifikantně nižší koncentraci sérového kreatininu než pacienti s ledvinou od zemřelých dárců. Tyto statisticky významné hodnoty byly zjištěny jak u skupiny pacientů pouze s AMR, tak i u skupiny pacientů s AMR a současnou ACR. Je známo, že ledviny od žijících dárců mají celkově delší dobu přežití a lepší funkci než ledviny od zemřelých dárců (Galliford & Game, 2009, Matas & Delmonico, 2012). Mnoho známých a neznámých faktorů má vliv na tento úkaz, jako je kratší doba ischemie, menší stres orgánu od živého dárce a abnormální fyziologický stav u zemřelých dárců, exprese prozánětlivých molekul ad. (Koo et al., 1999). Zvýšená koncentrace sérového kreatininu značí neúplnou nebo poškozenou funkci štěpu, což je u štěpů pocházejících z kadaverózního dárce poměrně častá komplikace.

V této diplomové práci jsme porovnali vybrané rizikové faktory ve vztahu k výskytu humorální rejekce. Nezjistili jsme signifikantní vliv vyššího počtu HLA neshod mezi pacientem a dárce a zvýšenými PRA na incidenci AMR a ACR. Je známo, že vysoké PRA jsou důležitým rizikovým faktorem AMR, z důvodu ale malého počtu pacientů v naší studii, tuto souvislost jsme neprokázali.

Při stanovení BAFF cytokinu v sérech pacientů odebraných po transplantaci (v době rejekce) jsme překvapivě shledali signifikantně nižší hodnoty u příjemců s AMR ($n = 19$). Soubor jsme potom analyzovali zvlášť – pacienty, kteří měli pouze AMR ($n = 10$) a pacienty, kteří měli AMR a zároveň ACR ($n = 9$). Došli jsme ke zjištění, že skupina pacientů jen s AMR nemá ve srovnání s kontrolní skupinou signifikantně nižší hodnoty BAFF ($p = 0,065$). Naproti tomu pacienti se současným vývojem jak AMR, tak ACR, měli signifikantně nižší koncentraci BAFF cytokinu v porovnání s pacienty bez rejekce.

U naměřených hodnot BAFF cytokinu v séru před transplantací nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami bez rejekce, s AMR a u skupiny s AMR současně i s ACR. Byl pozorován ale sestupný trend mezi skupinami, kdy pacienti bez

rejekce vykazovali průměrně nejvyšší hodnoty BAFF cytokinu oproti průměrným hodnotám u pacientů s AMR a AMR+ACR.

V literatuře jsme nenašli zatím žádnou zmínku o nižších hladinách BAFF cytokinu v séru po transplantaci. Publikace uvádí u pacientů s nekompatibilní transplantací (přítomné DSA + u některých AB0 inkompatibilita) zvýšené hodnoty BAFF před transplantací u pacientů s akutní humorální rejekcí. Nicméně stejná korelace se nevyskytla u příjemců ledviny s kompatibilní transplantací (Banham et al., 2013). U jiných studií nebyla zjištěna signifikantní korelace koncentrace solubilního BAFF cytokinu s výskytem akutní humorální rejekce (Xu et al., 2009b, Thibault-Espitia et al., 2012, Snanoudj et al., 2014). Nicméně, při analýze průtokovou cytometrií, kdy byl zkoumán membránově vázaný BAFF, byly zjištěny signifikantně zvýšené hodnoty u pacientů s abnormální funkcí ledviny (Xu et al., 2009b). Dle našeho úsudku by nižší koncentrace BAFF u pacientů s AMR mohla být způsobena vyvázáním BAFF cytokinu B lymfocyty, popřípadě plazmatickými buňkami. Signifikantně nižší koncentraci BAFF u pacientů se současnou AMR i ACR si vysvětlujeme vyvázáním BAFF jak B lymfocyty, tak i T lymfocyty, které se podílejí na celulární rejekci a taktéž na svém povrchu exprimují receptory pro BAFF (BAFF-R, TACI).

Pro porovnání funkce transplantovaných orgánů jsme korelovali koncentrace sérového kreatininu s hladinou BAFF cytokinu u pacientů bez a s rejekcí (AMR a pacienti s AMR i s ACR). Nezjistili jsme žádný vztah mezi hodnotami. To znamená, že na našem souboru se nepodařilo prokázat, že BAFF cytokin by mohl sloužit jako marker zhoršené funkce štěpu.

Dále jsme porovnávali koncentraci BAFF s přítomností PRA u pacientů s AMR i bez ní. Pacienti s AMR, kteří měli PRA vyšší než 50 % ($n = 2$), měli signifikantně vyšší hladiny BAFF. V případě, kdy jsme za pozitivní považovali hladiny PRA vyšší než 10 %, jsme nezaznamenali signifikantní korelaci mezi PRA a BAFF. Naše výsledky jsou v souladu se studií, kde bylo zjištěno, že pacienti, s anti-HLA protilátkami měli vyšší koncentraci BAFF v séru (Snanoudj et al., 2014). Dále bylo publikováno, že hladiny PRA korelují v periférii s membránově vázanou formou BAFF (Xu et al., 2009).

U pacientů s AMR jsme zkoumali, zda výskyt donor-specifických protilátek koreluje s hladinou BAFF před a po transplantaci. Z celkového počtu 12, mělo DSA 7 pacientů. Nezjistili jsme žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami s DSA a bez DSA. Tento náález je v rozporu s některými publikacemi, kde bylo pozorováno, že pacienti

s DSA proti HLA antigenům I. třídy měli vyšší koncentrace BAFF (Zarkhin et al., 2009). Thibault-Espitia et al. (Thibault-Espitia et al., 2012) ukázal, že pacienti po transplantaci ledviny s vyšší koncentrací BAFF mají signifikantně větší riziko produkce DSA, avšak tento nálezný nebyl potvrzen jinou novější studií (Snanoudj et al., 2014).

Analýza prováděná ve většině HLA laboratoří před transplantací ledviny se zaměřuje především na detekci protilátek proti HLA antigenům (tzv. PRA, panel reaktivní protilátky). Využívají se metody jako je komplement–dependentní test, průtoková cytometrie (už zřídka z důvodu pracnosti a nástupu Limunex techniky), xMAP technika (Luminex) a ELISA test. Hladiny protilátek po transplantaci se mohou měnit v závislosti na různých okolnostech, jako jsou především inhibice produkce protilátek imunosupresí anebo jinými faktory. Avšak analýz, které před transplantací poskytují informace o kapacitě alospecifických buněk produkovat protilátky, a tudíž mohou mapovat humorální imunitní odpověď příjemce, je velmi málo.

Metoda IgG ELISpot poskytuje informace o počtu B buněk, které jsou schopny produkce IgG protilátek. Nedávno byla publikována studie vědecké skupiny z Leidenu, která poukazuje, že IgG ELISpot může být užitečná pro predikci produkce protilátek po transplantaci ledviny a pro monitoraci aktuálního stavu pacienta. (Heidt et al., 2012).

V další části práce jsme se zaměřili na analýzu jiné skupiny pacientů, než byla popisována u experimentu výše. V tomto souboru všichni pacienti podstoupili transplantaci od živého dárce. Pacienti byli sledováni na výskyt humorální rejekce po dobu 3 let po transplantaci. Analýza demografických údajů neprokázala signifikantní vliv věku příjemce a dárce, pohlaví příjemce, počtu transplantací, neshod v krevní skupině nebo typu indukční a udržovací imunosuprese na vznik akutní humorální rejekce.

Nezjistili jsme signifikantní rozdíly při srovnání hladin sérového kreatininu u pacientů s humorální rejekcí a bez ní. Tyto výsledky se liší od experimentu s BAFF cytokinem, kde jsme pozorovali signifikantně vyšší hladiny kreatininu u pacientů s rejekcí. Jak bylo uvedeno výše, koncentrace sérového kreatininu nejspíše korelují s výskytem rejekce pouze u příjemců s ledvinou od zemřelého dárce z důvodu lepšího přežívání štěpu od živého dárce.

Bylo již prokázáno, že přítomnost PRA před transplantací snižuje dobu přežití štěpu a zvyšuje riziku vzniku rejekce (Terasaki, 2003). Ve skupině s AMR, neměl před

transplantací žádný pacient panel reaktivní protilátky nad 10 %. Při vyhodnocení vlivu počtu neshod v HLA antigenech na vznik AMR jsme nezjistili statisticky významné rozdíly. Avšak je vidět mírný vzestupný trend u pacientů s AMR ($4,3 \pm 1,6$) v počtu neshod v HLA antigenech oproti pacientům bez rejekce ($3,3 \pm 1,3$). To znamená, že DSA proti HLA antigenům II. třídy by mohly být rizikovým faktorem humorální rejekce a měly by být brány v potaz při výběru vhodného příjemce orgánu. Avšak u křížové zkoušky pomocí průtokové cytometri s B lymfocyty (FCXM) jsme pozorovali významnou korelaci s výskytem AMR.

Vyhodnocení korelace počtů IgG produkujících buněk v ELISpot a incidence humorální rejekce přineslo i přes poměrně malý počet pacientů, pozitivní výsledek. Byla shledána významně vyšší frekvence spotů v reakci proti dárce mezi pacienty s AMR a bez ní ($43,3 \pm 33,4$ u pacientů bez rejekce a $90,6 \pm 57,2$ u pacientů s AMR). Dále jsme pozorovali významně vyšší počet buněk produkujících IgG v reakci proti buňkám dárce ve srovnání s reakcí proti vlastním buňkám (autologní) u pacientů s AMR ($23,7 \pm 21,3$ spotů při autologní reakci a $90,6 \pm 57,2$ spotů při reakci proti dárce). Tento významný rozdíl jsme zjistili i u pacientů bez rejekce ($17,7 \pm 11,4$ u autologní reakce a $43,3 \pm 33,4$ u alogenní reakce). U pacientů s AMR jsme rovněž zjistili statisticky významně vyšší hodnotu stimulačního indexu (SI – podíl alogenní a autologní reakce) oproti pacientům bez rejekce ($2,7 \pm 1,9$ u pacientů bez rejekce a $5,8 \pm 5,7$ u pacientů s AMR). Tyto výsledky naznačují, že pacienti s humorální rejekcí mají dvakrát vyšší frekvenci buněk produkujících IgG než pacienti bez rejekce.

Při zjišťování specifity protilátek produkovaných B buňkami v buněčných supernatantech pomocí metody Luminex jsme nedokázali detekovat žádné protilátky. Pravděpodobně negativní nález je způsoben velmi nízkou koncentrací protilátek v supernatantech buněčných kultur. V podobných studiích byla detekována specifita protilátek, avšak v kultuře byly přítomné B buněčné linie, ostatní populace lymfocytů (T lymfocyty a NK lymfocyty) byly odstraněny a pravděpodobně proto supernatanty měly vyšší koncentraci HLA protilátek (Heidt et al., 2012). Han et al. (Han et al., 2009) uvádí, že pro detekci protilátek v séru pomocí Luminexu byly supernatanty 10x koncentrovány. Nicméně, s velkou pravděpodobností můžeme tvrdit, že protilátky produkované v IgG ELISpotu v našem experimentu jsou namířené proti dárce. Je to způsobeno přímou stimulací buněk příjemce buňkami dárce ve smíšených lymfocytárních kulturách. B lymfocyty, které produkují zmíněné protilátky, rozpoznávají neshodné HLA antigeny dárce, tudíž jejich specifita by měla být proti těmto HLA antigenům.

Pomocí metody IgG ELISpot jsme zjistili, že pacienti s AMR mají přibližně dvakrát vyšší frekvenci B lymfocytů produkujících protilátky IgG namířené s největší pravděpodobností proti dárce. Nicméně, vzhledem k malému sledovanému počtu pacientů s AMR ($n = 6$), je zapotřebí ověřit naše výsledky na větším souboru pacientů. Je nutné podotknout, že buňky z periferní krve příjemce jsme stimulovali ve smíšených lymfocytárních kulturách přímo buňkami dárce. Podle našeho nejlepšího vědomí nebyl tento způsob stimulace zatím nikde publikován. V publikacích zabývajících se IgG ELISpotem stimulují B lymfocyty v kultuře s podpůrnými buňkami, které poskytují CD40 ligand za přítomnosti stimulujícího koktejlu cytokinů (Han et al., 2009, Heidt et al., 2012).

Závěrem lze říci, že obě metody předkládané v této práci mají velký potenciál v charakterizaci B buněčné odpovědi u příjemců s transplantovanými ledvinami. Je však nutné provést řadu dalších testů, zda by zde popisované metody mohly umožnit rozsáhlé monitorování pacientů před a po transplantaci. Zjištěné výsledky naznačují určitou spojitost koncentrace BAFF cytokinu po transplantaci s výskytem humorální a současně celulární rejekce. Metoda IgG ELISpot by z našeho pohledu mohla sloužit jako prediktivní test rizika humorální rejekce před transplantací ledviny.

7 Závěr

1. Při porovnání koncentrace BAFF cytokinu v séru před transplantací jsme nezjistili žádné signifikantní rozdíly mezi pacienty bez rejekce a s akutní humorální rejekcí.
2. Zjistili jsme, že hladina BAFF cytokinu po transplantaci je signifikantně nižší u pacientů s akutní humorální a současnou celulární rejekcí než u pacientů bez rejekce. Pacienti, kteří měli jen akutní humorální rejekci, měli nižší koncentraci BAFF cytokinu oproti pacientům bez rejekce. Avšak tyto hodnoty nebyly shledány jako signifikantní.
3. Na oddělení imunogenetiky IKEM byla zavedena metoda IgG ELISpot. Pomocí ní, jsme detekovali protilátky produkované B lymfocyty příjemce odebrané před transplantací ledviny od živých dárců.
4. Prokázali jsme signifikantní rozdíl mezi frekvencí spotů v alogenní reakci (reakce příjemce proti dárci) u pacientů s akutní humorální rejekcí a pacientů bez rejekce. Podařilo se prokázat potenciální význam této metody v predikci rizika vývoje humorální rejekce po transplantaci ledviny.

8 Seznam obrázků

Obr. 1: HLA systém na chromozomu 6.	8
Obr. 2: Schematické znázornění struktury HLA molekul I. a II. třídy	9
Obr. 3: Přímé (A) a nepřímé (B) rozpoznání HLA molekul	11
Obr. 4: Mechanismus polopřímého rozpoznání.....	12
Obr. 5: Schematické znázornění aktivace efektorových mechanismů způsobující poškození štěpu.	13
Obr. 6: Aktivace komplementu donor-specifickými protilátkami vedoucí k poškození štěpu a infiltraci neutrofilů, makrofágů (MF) a NK buněk	16
Obr. 7: Schematické znázornění vývoje B lymfocytů.	20
Obr. 8: Maturace B lymfocytů a znázornění změny exprese povrchových molekul v různých vývojových stádiích	22
Obr. 9: Schematické znázornění přípravy standardů.	30
Obr. 10: Koncentrace sérového kreatininu v závislosti na výskytu akutní humorální rejekce..	39
Obr. 11: Koncentrace sérového kreatininu v závislosti na typu dárce u pacientů s akutní humorální rejekcí.	39
Obr. 12: Koncentrace sérového kreatininu v závislosti na výskytu kombinované rejekce (AMR + ACR).....	40
Obr. 13: Koncentrace BAFF před a po transplantaci u pacientů bez rejekce a s akutní humorální rejekcí.	42
Obr. 14: Koncentrace BAFF cytokinu před a po transplantaci (u pacientů s kombinovanou rejekcí).....	44
Obr. 15: Korelace koncentrace sérového kreatininu s koncentrací sérového BAFF u pacientů s AMR a současnou ACR.....	46
Obr. 16: Srovnání přítomnosti PRA s koncentrací BAFF cytokinu před a po transplantaci u pacientů s akutní humorální rejekcí.	47
Obr. 17: Koncentrace BAFF cytokinu před (A) a po transplantaci (B) v závislosti na přítomnosti donor-specifických protilátek.	47
Obr. 18: Frekvence spotů a výskyt akutní humorální rejekce.	50
Obr. 19: Srovnání stimulačního indexu mezi pacienty bez akutní humorální rejekce a s akutní humorální rejekcí.	52
Obr. 20: Frekvence spotů po odečtení autologní reakce od alogenní reakce ve vztahu k výskytu akutní humorální rejekce.	52

9 Literatura

- Abe, M., Kawai, T., Futatsuyama, K., Tanabe, K., Fuchinoue, S., Teraoka, S., ... Ota, K. (1997). Postoperative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation*, 63(11), 1616–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197356>
- Afzali, B., Lechler, R. I., & Hernandez-Fuentes, M. P. (2007). Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens*, 69(6), 545–56. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00834.x
- Allman, D., & Miller, J. P. (2003). Common Lymphoid Progenitors , Early B-Lineage Precursors , and IL-7. *Immunologic Research*, 27(2-3), 131–139.
- Avery, D. T., Ellyard, J. I., Mackay, F., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., & Tangye, S. G. (2005). Increased expression of CD27 on activated human memory B cells correlates with their commitment to the plasma cell lineage. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174(7), 4034–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15778361>
- Banham, G., Prezzi, D., Harford, S., Taylor, C. J., Hamer, R., Higgins, R., ... Clatworthy, M. R. (2013). Elevated pretransplantation soluble BAFF is associated with an increased risk of acute antibody-mediated rejection. *Transplantation*, 96(4), 413–20. doi:10.1097/TP.0b013e318298dd65
- Bassing, C. H., Swat, W., & Alt, F. W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell*, 109, 45–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11983152>
- Bloom, D., Chang, Z., Pauly, K., Kwun, J., Fechner, J., Hayes, C., ... Knechtle, S. (2009). BAFF is increased in renal transplant patients following treatment with alemtuzumab. *American Journal of Transplantation*, 9(8), 1835–45. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02710.x
- Böhmig, G. A., Wahrmann, M., & Säemann, M. A. (2010). Detecting Adaptive Immunity. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 14(1), 1–11.
- Brown, V. I., Hulitt, J., Fish, J., Sheen, C., Bruno, M., Xu, Q., ... Grupp, S. a. (2007). Thymic stromal-derived lymphopoietin induces proliferation of pre-B leukemia and antagonizes mTOR inhibitors, suggesting a role for interleukin-7Ralpha signaling. *Cancer Research*, 67(20), 9963–70. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4704
- Burns, J. M., Cornell, L. D., Perry, D. K., Pollinger, H. S., Gloor, J. M., Kremers, W. K., ... Stegall, M. D. (2008). Alloantibody levels and acute humoral rejection early after positive crossmatch kidney transplantation. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 8(12), 2684–94. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02441.x

- Colvin, R. B., & Smith, R. N. (2005). Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature Reviews. Immunology*, 5(10), 807–17. doi:10.1038/nri1702
- El-Awar, N., Terasaki, P., Lazda, V., Nikaein, a, Manning, C., & Arnold, a N. (2002). Almost all patients who are waiting for a regrant of a kidney transplant have anti-HLA antibodies. *Transplantation Proceedings*, 34(7), 2531–2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431512>
- Galliford, J., & Game, D. S. (2009). Modern renal transplantation: present challenges and future prospects. *Postgraduate Medical Journal*, 85(1000), 91–101. doi:10.1136/pgmj.2008.070862
- Game, D. S., & Lechler, R. I. (2002). Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transplant Immunology*, 10(2-3), 101–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216939>
- Gross, J. A., Johnston, J., Mudri, S., Enselman, R., Dillon, S. R., Madden, K., ... Clegg, C. H. (2000). TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *Nature*, 404(6781), 995–9. doi:10.1038/35010115
- Hahne, M., Kataoka, T., Schröter, M., Hofmann, K., Irmeler, M., Bodmer, J. L., ... Tschopp, J. (1998). APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(6), 1185–90. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212534&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Han, M., Rogers, J. a, Lavingia, B., & Stastny, P. (2009, January). Peripheral blood B cells producing donor-specific HLA antibodies in vitro. *Human Immunology*. doi:10.1016/j.humimm.2008.10.013
- Heidt, S., Roelen, D. L., de Vaal, Y. J. H., Kester, M. G. D., Eijnsink, C., Thomas, S., ... Mulder, A. (2012). A Novel ELISPOT assay to quantify HLA-specific B cells in HLA-immunized individuals. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(6), 1469–78. doi:10.1111/j.1600-6143.2011.03982.x
- Herrera, O. B., Golshayan, D., Tibbott, R., Salcido Ochoa, F., James, M. J., Marelli-Berg, F. M., & Lechler, R. I. (2004). A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(8), 4828–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470023>
- Hirohashi, T., Uehara, S., Chase, C. M., DellaPelle, P., Madsen, J. C., Russell, P. S., & Colvin, R. B. (2010). Complement Independent Antibody-Mediated Endarteritis and Transplant Arteriopathy in Mice. *American Journal of Transplantation*, 10(3), 510–517. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02958.x.Complement
- Huard, B., Schneider, P., Mauri, D., Tschopp, J., & French, L. E. (2001). T cell costimulation by the TNF ligand BAFF. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. :*

- 1950), 167(11), 6225–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714784>
- Choo, S. Y. (2007). The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal*, 48(1), 11–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2628004/>
- Chu, V. T., Enghard, P., Riemekasten, G., & Berek, C. (2007). In Vitro and In Vivo Activation Induces BAFF and APRIL Expression in B Cells. *The Journal of Immunology*, 179(9), 5947–5957.
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Zinkernagel, R. M., & Hengartner, H. (1996). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annual Review of Immunology*, 14, 207–32. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.207
- Khan, W. N. (2009). B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis. *Journal of Immunology*, 183(6), 3561–7. doi:10.4049/jimmunol.0800933
- Klein, J., & Sato, A. (2000). Advances in immunology - The HLA system - First of two parts. *New England Journal of Medicine*, 343(10), 702–709.
- Koo, D. D., Welsh, K. I., McLaren, a J., Roake, J. a, Morris, P. J., & Fuggle, S. V. (1999). Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney International*, 56(4), 1551–9. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00657.x
- Le Moine, A., Goldman, M., & Abramowicz, D. (2002). Multiple Pathways to Allograft Rejection. *Transplant Immunology*, 73(9), 1373–1381.
- Lederer, S. R., Kluth-Pepper, B., Schneeberger, H., Albert, E., Land, W., & Feucht, H. E. (2001). Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney International*, 59(1), 334–41. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00495.x
- Lefaucheur, C., Loupy, A., Hill, G. S., Andrade, J., Nochy, D., Antoine, C., ... Suberbielle-Boissel, C. (2010). Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21(8), 1398–406. doi:10.1681/ASN.2009101065
- Lewis, S. M., & Wu, G. E. (1997). The Origins of V (D) J Recombination Minireview. *Cell*, 88(2), 159–162.
- Mackay, F., & Ambrose, C. (2003). The TNF family members BAFF and APRIL: the growing complexity. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14(3-4), 311–324. doi:10.1016/S1359-6101(03)00023-6

- Manz, R. A., Arce, S., Cassese, G., Hauser, A. E., Hiepe, F., & Radbruch, A. (2002). Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Current Opinion in Immunology*, (14), 517–521.
- Mariette, X., Roux, S., Zhang, J., Bengoufa, D., Lavie, F., Zhou, T., & Kimberly, R. (2003). The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjögren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 62(2), 168–171.
- Marsters, S. a, Yan, M., Pitti, R. M., Haas, P. E., Dixit, V. M., & Ashkenazi, a. (2000). Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Current Biology : CB*, 10(13), 785–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10898980>
- Martinez, O. M., Ascher, N. L., Ferrell, L., Villanueva, J., Lake, J., Roberts, J. P., & Krams, S. M. (1993). Evidence for a nonclassical pathway of graft rejection involving interleukin 5 and eosinophils. *Transplantation*, 55(4), 909–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8475567>
- Matas, A. J., & Delmonico, F. L. (2012). Living donation: the global perspective. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 19(4), 269–75. doi:10.1053/j.ackd.2012.05.003
- Mauiyyedi, S., & Colvin, R. B. (2002). Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 11(6), 609–18. doi:10.1097/01.mnh.0000040046.33359.cf
- Mauiyyedi, S., Crespo, M., Collins, a B., Schneeberger, E. E., Pascual, M. a, Saidman, S. L., ... Colvin, R. B. (2002). Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(3), 779–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856785>
- Maurer, D., Holter, W., Majdic, O., Fischer, G. F., & Knapp, W. (1990). CD27 expression by a distinct subpopulation of human B lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 20(12), 2679–84. doi:10.1002/eji.1830201223
- Melamed, D., Benschop, R. J., Cambier, J. C., & Nemazee, D. (1998). Developmental regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection. *Cell*, 92(2), 173–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9458042>
- Mukhopadhyay, a., Ni, J., Zhai, Y., Yu, G.-L., & Aggarwal, B. B. (1999). Identification and Characterization of a Novel Cytokine, THANK, aTNF Homologue That Activates Apoptosis, Nuclear Factor- B, and c-Jun NH2-Terminal Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(23), 15978–15981. doi:10.1074/jbc.274.23.15978
- Murata, K., & Baldwin, W. M. (2009). Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplantation Reviews*, 23(3), 139–50. doi:10.1016/j.trre.2009.02.005

- Nardelli, B., Belvedere, O., Roschke, V., Moore, P. a, Olsen, H. S., Migone, T. S., ... Hilbert, D. M. (2001). Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells. *Blood*, 97(1), 198–204. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133761>
- Nickeleit, V., Zeiler, M., Gudat, F., Thiel, G., & Mihatsch, M. J. (2002). Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(1), 242–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752044>
- O'Connor, B. P., Raman, V. S., Erickson, L. D., Cook, W. J., Weaver, L. K., Ahonen, C., ... Noelle, R. J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(1), 91–8. doi:10.1084/jem.20031330
- Ota, M., Duong, B. H., Torkamani, A., Doyle, C. M., Gavin, A. L., Ota, T., & Nemazee, D. (2010). Regulation of the B cell receptor repertoire and self-reactivity by BAFF. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(7), 4128–36. doi:10.4049/jimmunol.1002176
- Palanichamy, A., Barnard, J., Zheng, B., Owen, T., Quach, T., Looney, R. J., ... Anolik, J. H. (2010). Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *Journal of Immunology*, 182(10), 5982–5993. doi:10.4049/jimmunol.0801859.Novel
- Patel, R., & Terasaki, P. I. (1969). Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 280(14), 735–739. doi:10.1056/NEJM196904032801401
- Penn, D. J. (2002). *Major Histocompatibility. Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–7). doi:10.1038/npg.els.0003986
- Pewzner-Jung, Y., Friedmann, D., Sonoda, E., Jung, S., Rajewsky, K., & Eilat, D. (1998). B cell deletion, anergy, and receptor editing in “knock in” mice targeted with a germline-encoded or somatically mutated anti-DNA heavy chain. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(9), 4634–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794392>
- Pieper, K., Grimbacher, B., & Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131(4), 959–71. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.046
- Prak, E. T. L., Monestier, M., & Eisenberg, R. A. (2011). B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Annals Of The New York Academy Of Sciences, January*(1217), 96–121. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05877.x.B
- Puttarajappa, C., Shapiro, R., & Tan, H. P. (2012). Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *Journal of Transplantation*, 2012, 9. doi:10.1155/2012/193724

- Racusen, L. C., & Haas, M. (2006). Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 1(3), 415–20. doi:10.2215/CJN.01881105
- Robinson, J., Mistry, K., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P., & Marsh, S. G. E. (2011). The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue), D1171–6. doi:10.1093/nar/gkq998
- Rogers, N. J., & Lechler, R. I. (2001). Alloreognition. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 1(2), 97–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12099369>
- Ruddle, N., & Akirav, E. (2009). Secondary lymphoid organs: responding to genetic and environmental cues in ontogeny and the immune response. *Journal of Immunology*, 183(4), 2205–2212. doi:10.4049/jimmunol.0804324.Secondary
- Sarantopoulos, S., Stevenson, K. E., Kim, H. T., Cutler, C. S., Bhuiya, N. S., Schowalter, M., ... Ritz, J. (2009). Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 113(16), 3865–74. doi:10.1182/blood-2008-09-177840
- Scapini, P., Nardelli, B., Nadali, G., Calzetti, F., Pizzolo, G., Montecucco, C., & Cassatella, M. a. (2003). G-CSF-stimulated Neutrophils Are a Prominent Source of Functional BLYS. *Journal of Experimental Medicine*, 197(3), 297–302. doi:10.1084/jem.20021343
- Seidel, U. J. E., Schlegel, P., & Lang, P. (2013). Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Frontiers in Immunology*, 4(March), 8. doi:10.3389/fimmu.2013.00076
- Seshasayee, D., Valdez, P., Yan, M., Dixit, V. M., Tumas, D., & Grewal, I. S. (2003). Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. *Immunity*, 18(2), 279–88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12594954>
- Shresta, S., Pham, C. T. N., Thomas, D. A., Graubert, T. A., & Ley, T. J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Current Opinion in Immunology*, 10(5), 581–587.
- Shulga-morskaya, S., Dobles, M., Walsh, M. E., Ng, L. G., Mackay, F., Rao, S. P., ... Kalled, S. L. (2004). B-cell Activating Factor Belonging to the TNF Family Acts through Separate Receptors to Support B cell Survival and T Cell-Independent Antibody Formation. *The Journal of Immunology*, 173, 2331–2341.
- Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., ... Scott, M. L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5537), 2111–4. doi:10.1126/science.1061964

- Schmid, D. S., Tite, J. P., & Ruddle, N. H. (1986). DNA fragmentation: manifestation of target cell destruction mediated by cytotoxic T-cell lines, lymphotoxin-secreting helper T-cell clones, and cell-free lymphotoxin-containing supernatant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(6), 1881–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323188&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J. L., Holler, N., ... Tschopp, J. (1999). BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(11), 1747–56. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Slavcev, A., & Dyer, P. (2009). Antibody Responses in Immunosuppressed Organ Allograft Recipients - Brief Review of the Current Literature. *Current Immunology Reviews*, 5(2), 161–166. doi:10.2174/157339509788167010
- Slifka, M. K., & Ahmed, R. (1998). Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production. *Current Opinion in Immunology*, 10(3), 252–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9638360>
- Small, T. N., Robinson, W. H., & Miklos, D. B. (2009). B cells and transplantation: an educational resource. *Biology of Blood and Marrow Transplantation : Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 15(1 Suppl), 104–13. doi:10.1016/j.bbmt.2008.10.016
- Snanoudj, R., Candon, S., Roelen, D. L., Jais, J.-P., Claas, F. H., Legendre, C., & Chatenoud, L. (2014). Peripheral B-cell phenotype and BAFF levels are associated with HLA immunization in patients awaiting kidney transplantation. *Transplantation*, 97(9), 917–24. doi:10.1097/01.TP.0000438211.34842.5e
- Steele, B. D. J. R., Lauferfl, T. M., Smileyfl, S. T., Ando, Y., Grusbyfi, M. J., Glimcherfl, L. H., & Auchincloss, H. (1996). Brief Definitive Report Two Levels of Help for B Cell Alloantibody Production. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(February), 699–703.
- Stegall, M. D., Chedid, M. F., & Cornell, L. D. (2012). The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nature Reviews. Nephrology*, 8(11), 670–8. doi:10.1038/nrneph.2012.212
- Stegall, M. D., Moore, N., Taner, T., Li, H., & Dean, P. G. (2014). Down-regulating humoral immune responses: implications for organ transplantation. *Transplantation*, 97(3), 247–57. doi:10.1097/TP.0b013e3182a72115
- Sutherland, A. P. R., Ng, L. G., Fletcher, C. a, Shum, B., Newton, R. a, Grey, S. T., ... Mackay, C. R. (2005). BAFF augments certain Th1-associated inflammatory responses. *Journal of Immunology*, 174(9), 5537–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843552>

- Tangye, S. G. (2011). Staying alive: regulation of plasma cell survival. *Trends in Immunology*, 32(12), 595–602. doi:10.1016/j.it.2011.09.001
- Terasaki, P. I. (2003). Humoral theory of transplantation. *American Journal of Transplantation*, 3(6), 665–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396319>
- Thibault-Espitia, a, Foucher, Y., Danger, R., Migone, T., Pallier, a, Castagnet, S., ... Brouard, S. (2012). BAFF and BAFF-R levels are associated with risk of long-term kidney graft dysfunction and development of donor-specific antibodies. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(10), 2754–62. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04194.x
- Thompson, J. S., Bixler, S. A., Qian, F., Vora, K., Scott, M. L., Cachero, T. G., ... Ambrose, C. (2001). BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5537), 2108–11. doi:10.1126/science.1061965
- Tiercy, J. M. (2002). Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. *Transplant Immunology*, 9(2-4), 173–180. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12180827>
- Tobón, G. J., Izquierdo, J. H., & Cañas, C. a. (2013). B lymphocytes: development, tolerance, and their role in autoimmunity-focus on systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Diseases*, 2013, 17. doi:10.1155/2013/827254
- Viklický, O., Janoušek, L., & Kolektiv, P. B. a. (2008). *Transplantace ledviny v klinické praxi* (p. 380). Praha: Grada Publishing a.s.
- Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M., & Mond, J. J. (2000). B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews*, 176(1), 154–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11043775>
- Xu, H., He, X., Liu, Q., Shi, D., Chen, Y., Zhu, Y., & Zhang, X. (2009). Abnormal high expression of B-cell activating factor belonging to the TNF superfamily (BAFF) associated with long-term outcome in kidney transplant recipients. *Transplantation Proceedings*, 41(5), 1552–6. doi:10.1016/j.transproceed.2008.10.024
- Zarkhin, V., Chalasani, G., & Sarwal, M. M. (2010). The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance. *Transplantation Reviews*, 24(2), 67–78. doi:10.1016/j.trre.2010.01.004
- Zarkhin, V., Kambham, N., Li, L., Kwok, S., Hsieh, S.-C., Salvatierra, O., & Sarwal, M. M. (2008). Characterization of intra-graft B cells during renal allograft rejection. *Kidney International*, 74(5), 664–73. doi:10.1038/ki.2008.249

- Zarkhin, V., Li, L., & Sarwal, M. M. (2009). BAFF may modulate the rate of B-cell repopulation after rituximab therapy for acute renal transplant rejection. *Transplantation*, 88(10), 1229–30. doi:10.1097/TP.0b013e3181bbb1a1
- Zhang, J., Roschke, V., Baker, K. P., Wang, Z., Alarcon, G. S., Fessler, B. J., ... Zhou, T. (2001). Cutting Edge: A Role for B Lymphocyte Stimulator in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, 166(1), 6–10. doi:10.4049/jimmunol.166.1.6
- Zotos, D., & Tarlinton, D. M. (2012). Determining germinal centre B cell fate. *Trends in Immunology*, 33(6), 281–8. doi:10.1016/j.it.2012.04.003